



Uniwersytet Warszawski
Wydział Chemii

Wioletta Liwińska

Systemy hydrożelowe modyfikowane oligonukleotydami jako potencjalne nośniki leków

Praca doktorska wykonana w
Pracowni Teorii i Zastosowań Elektrood
pod kierunkiem prof. dr hab. Zbigniewa Stojka

Warszawa, 2019

Składam serdeczne podziękowania:

prof. dr hab. Zbigniewowi Stojkowi

za cenne i trafne wskazówki merytoryczne

dr Ewelinie Zabost

za ukierunkowanie mojej pracy badawczej,

pomoc, poświęcony czas oraz cenne uwagi

Koleżankom i kolegom z

Pracowni Teorii Zastosowań elektrod

za pomoc i miłą atmosferę podczas pracy

Mężowi

za wsparcie, cierpliwość oraz

wszechstronną pomoc w

realizowaniu marzeń

Mamie

za nieustanne motywowanie mnie

oraz wiarę w moje możliwości

Teściom oraz szwagierce

za nieocenioną pomoc w opiece nad córką

podczas długich godzin spędzonych na pisaniu pracy



Praca została finansowana częściowo przez grant Narodowego Centrum Nauki

NCN 2015/19/N/ST5/03672

Spis treści

1. Wstęp i cele pracy	10
CZĘŚĆ TEORETYCZNA	13
2. Nośniki leków	14
2.1. Rola nośników leków	15
2.2. Rodzaje transportu nośników leków w ustroju	17
2.3. Rodzaje nośników leków	19
2.3.1. Nośniki leków utworzone z nieorganicznych związków	20
2.3.2. Nośniki leków na bazie lipidów	24
2.3.3. Polimerowe nośniki leków	26
3. Hydrożele polimerowe	30
3.1. Definicja i rodzaje żeli polimerowych.....	31
3.2. Przejście fazowe „inteligentnych żeli polimerowych”	32
3.3. Hydrożele czule na temperaturę	34
3.4. Hydrożele czule na pH	35
3.5. Hydrożele czule na substancje biologicznie aktywne	37
3.5.1. Hydrożele czule na glukozę	38
3.5.2. Hydrożele czule na enzymy	39
3.5.3. Hydrożele czule na glutation.....	40
3.6. Hydrożele modyfikowane DNA.....	41
4. Nanożele i mikrożele polimerowe	44

4.1. Charakterystyka i klasyfikacja	45
4.2. Synteza	47
4.2.1. Polimeryzacja w roztworze	48
4.2.2. Polimeryzacja emulsyjna.....	49
4.3. Modyfikacja nanożeli materiałem biologicznym	51
5. Oligonukleotydy w systemach kontrolowanego dostarczania leków	54
5.1. Budowa DNA.....	55
5.2. Czynniki powodujące zmiany struktury DNA.....	59
5.3. Oddziaływania DNA z lekami antracyklinowymi	62
5.4. Detekcja DNA	65
5.4.1. Metody elektrochemiczne	66
5.4.2. Metody spektroskopowe	68
CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA.....	70
6. Aparatura i odczynniki	71
6.1. Aparatura	71
6.2. Odczynniki	72
7. Techniki Badawcze.....	75
7.1. Spektroskopia UV-Vis.....	75
7.2. Spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera (FTIR)	77
7.3. Dynamiczne rozpraszania światła (DLS)	78
7.4. Mikroskopia elektronowa	81

7.4.1.	Transmisyjna	82
7.4.2.	Skaningowa	83
7.5.	Woltamperometria cykliczna (CV)	84
7.6.	Woltamperometria fali prostokątnej (SWV)	86
7.7.	Elektrochemiczna spektroskopia impedancyjna (EIS)	87
8.	Hydrożele modyfikowane DNA w skali makro	90
8.1.	Hydrożele PAM/DNA.....	90
8.1.1.	Synteza i oczyszczanie	90
8.1.2.	Morfologia.....	94
8.1.3.	Właściwości elektrochemiczne	95
8.1.4.	Zastosowanie matryc hydrożelowych do uwalniania leków	100
8.1.5.	Podsumowanie	107
9.	Nanohydrożele modyfikowane DNA	108
9.1.	Nanożele sieciowane BIS i modyfikowane hybrydą DNA.....	108
9.1.1.	Synteza	112
9.1.2.	Analiza rozmiaru cząstek i potencjału zeta	116
9.1.3.	Analiza objętościowego przejścia fazowego.....	117
9.1.4.	Morfologia.....	122
9.1.5.	Analiza procesu hybrydyzacji i wprowadzenia nici DNA	124
9.1.6.	Badanie akumulacji i oddziaływań lek-DNA.....	128
9.1.7.	Badania in vitro uwalniania leku z nanożeli	130

9.1.8.	Badania komórkowe - test cytotoksyczności MTT	132
9.1.9.	Podsumowanie	135
9.2.	Nanożele sieciowane zhybrydowaną nicią DNA	135
9.2.1.	Synteza	136
9.2.2.	Morfologia.....	138
9.2.3.	Analiza rozmiaru cząstek i potencjału zeta	140
9.2.4.	Badanie objętościowego przejścia fazowego i degradacji sieci.....	141
9.2.5.	Badanie obecności DNA i zmian w jego strukturze.....	145
9.2.6.	Akumulacja i uwalnianie leku in vitro	147
9.2.7.	Cytotoksyczność.....	150
9.2.8.	Podsumowanie	152
9.3.	Nanożele z DNA zmodyfikowanym mostkami –S-S-.....	153
9.3.1.	Synteza	154
9.3.2.	Morfologia.....	156
9.3.3.	Analiza organizacji przestrzennej DNA w nanożelach.....	157
9.3.4.	Analiza rozmiaru cząstek i potencjału zeta	160
9.3.5.	Analiza wpływu GSH na degradację nanożeli	163
9.3.6.	Badanie akumulacji i uwalniania leku	166
9.3.7.	Cytotoksyczność.....	171
9.3.8.	Podsumowanie	172
10.	Końcowe wnioski	173

11. Streszczenie w języku polskim	175
12. Streszczenie w języku angielskim	179
13. Spis publikacji powstałych podczas realizacji doktoratu.....	182
14. Literatura	183

1. Wstęp i cele pracy

Jednym z głównych celów współczesnej biomedycyny jest poszukiwanie nowych rozwiązań w terapii przeciwnowotworowej ograniczających toksyczność leków względem komórek zdrowych, a także ukierunkowanie badań na bezpośrednie podawanie leków do komórek nowotworowych. Aby ten cel osiągnąć, stosując znane i przebadane już terapie nowotworowe, konieczne jest stosowanie odpowiednich nośników leków.

Wśród wielu rodzajów nośników „inteligentne hydrożele,” ze względu na duże możliwości chłonięcia płynów, a przez to podobną strukturę do tkanek ludzkich, ale przede wszystkim na czułość środowiskową, mogą być dobrym materiałem do konstrukcji kontrolowanych systemów dostarczania leków. Modyfikacja hydrożeli materiałem biologicznym daje możliwość kontroli ich właściwości pod wpływem nowych czynników i wpływa bezpośrednio na ich biokompatybilność. DNA jako uniwersalny materiał budulcowy, posiadający zdolność zaprogramowanego parowania zasad, jest szeroko stosowany przez naukowców pod kątem tworzenia naturalnych biomateriałów. Dlatego też połączenie hydrożeli i oligonukleotydów może być dobrym kierunkiem w projektowaniu nowoczesnych systemów uwalniania leków.

Kontrolowane wywoływanie zmian strukturalnych w cząsteczkach DNA przyłączonych do sieci hydrożelu daje duże możliwości uwalniania leku pod wpływem różnorodnych bodźców środowiskowych. Dodatkowo, możliwość akumulacji cząsteczek leków na drodze interkalacji w helisie DNA pozwala na zwiększenie ilości leku zawartego w nośniku. Zależna od sekwencji zasad dynamiczna struktura nici DNA daje możliwość jej samoorganizacji, hybrydyzacji oraz denaturacji w zależności od środowiska, w jakim się znajduje.

Podstawowym celem mojej pracy doktorskiej była synteza i badanie właściwości wybranych nośników leków przeciwnowotworowych. Skupiłam się na syntezie materiałów hydrożelowych w skali makro i nano. Materiały żelowe modyfikowałam oligonukleotydami. Analizie poddane zostały takie parametry nośników jak wydajność akumulacji i szybkość uwalniania substancji leczniczej.

Matrycą w układzie hydrożelowym był poli(*N*-izopropylakryloamid) (PNIPA) zmodyfikowany kwasem akrylowym (AAc). Dzięki tej modyfikacji uzyskałam wyższe temperatury przejścia fazowego (VPT); zbliżone do temperatur fizjologicznych. Jednocześnie dodatek oligonukleotydów, jako silnie hydrofilowych składników, przesuwał również temperaturę VPT w kierunku wyższych wartości.

Głównym celem dokonanych modyfikacji żeli była zwiększona wydajność akumulacji leków-interkalatorów pomiędzy pary zasad dwuniciowej formy DNA. Istotne były również

oddziaływania elektrostatyczne i powinowactwo leku do konkretnych par zasad. Użyte w matrycach polimery: akryloamidu oraz N-izopropylakryloamidu posiadają możliwość chłonięcia dużych ilości rozpuszczalnika, co było pożądanym efektem uwzględnionym w projektowaniu nośników leków. Proste, niezmodyfikowane formy hydrożeli syntezowane w projekcie posiadają niski współczynnik akumulacji leków antracyklinowych. Wprowadzenie molekuł DNA zapewniło utworzenie miejsc wiązania się leku za pomocą niekwalencyjnej interakcji takiej jak interkalacja. Interkalacja pozwoliła na zwiększenie ilości leku wewnątrz nośnika; spowodowała również wydłużenie procesu uwalniania substancji leczniczej.

Mechanizm uwalniania leku z nośnika był wyzwalany za pomocą bodźców zewnętrznych. Testowane były różne czynniki środowiskowe, których zmiana powodowała uwalnianie leku. Te czynniki to temperatura, pH i obecność środka redukującego (np. glutationu). Przebadano różne warianty modyfikacji nanożeli obejmujące modyfikacje typu chemicznego i fizycznego.

Moim pierwszym zadaniem badawczym było zsyntezowanie hydrożeli w skali makro i ich fizykochemiczna modyfikacja natywną formą DNA. Modyfikacje te miały na celu udowodnienie, że możliwe jest trwałe wprowadzenie DNA do sieci hydrożelu w oparciu o oddziaływania elektrostatyczne. Planowałam badania związane z analizą procesu elektrotleniania zasad azotowych będących wewnątrz nanożelu jak i badanie zmian zachodzących w strukturze DNA pod wpływem zmiennych warunków środowiskowych. Nadrzędnym celem było użycie tego typu matryc, jako nośników do akumulacji i uwalniania leków przeciwnowotworowych uwalnianych pod wpływem wzrostu temperatury.

Kolejnym etapem moich badań była synteza hydrożeli w skali nano. Nanożełe ze względu na swoje niewielkie rozmiary charakteryzują się znacznie szybszą odpowiedzią na bodźce niż ich odpowiedniki w skali makro. Dzięki swoim małym rozmiarom mogą z łatwością penetrować tkanki i docierać bezpośrednio do celu. Daje to duże możliwości manipulacji ich właściwościami pod kątem uwalniania leków. Dlatego też w dalszej części mojej pracy skupiałam się na układach nano.

Pierwszy rodzaj zsyntezowanych przeze mnie nanonośników to nanożele z wprowadzonymi kowalencyjnie odcinkami DNA tworzącymi układ trzysegmentowej hybrydy przy zastosowaniu standardowo używanych środków sieciujących. Modyfikacje te miały na celu zmianę właściwości fizykochemicznych sieci polimerowej a co za tym idzie poprawienie akumulacji i uwalniania leków. Zakładałam, że tego typu materiały będą wykazywać przedłużone uwalnianie leku spowodowane oddziaływaniem z podwójną nicią DNA.

Kolejnym zadaniem badawczym było stworzenie nano/mikro żeli degradowalnych pod wpływem działania podwyższonej temperatury. Założyłam, że oligonukleotydy będą pełniły funkcję środka sieciującego dodawanego bezpośrednio podczas syntezy, a proces hybrydyzacji będzie zachodził jednocześnie z procesem polimeryzacji sieci. Stworzenie tego typu układu miało na celu szybkie uwalnianie dużej ilości leku pod wpływem czynnika temperaturowego, powodującego skurczenie sieci hydrożelu i denaturację podwójnej nici DNA.

Ostatnim celem mojej pracy badawczej była synteza nanożeli zmodyfikowanych oligonukleotydami posiadającymi zdolność do rozkładu pod wpływem czynników redukujących takich jak glutation. Otoczenie komórek nowotworowych posiada dużo wyższe stężenie glutationu niż komórek zdrowych. Dlatego też wprowadziłam dodatkowy czynnik stymulujący wyższe uwalnianie leku w warunkach zbliżonych do panujących w komórkach nowotworowych (obniżone pH, wysokie stężenie glutationu). Nanożele zsyntezowane w ten sposób były jednocześnie wrażliwe na trzy rodzaje bodźców: temperaturę, pH i obecność glutationu. Podwyższenie temperatury stymulowało dodatkowo uwalnianie leku, co wykorzystano przy sterowanym pulsami temperaturowymi uwalnianiu leku.

CZEŚĆ TEORETYCZNA

2. Nośniki leków

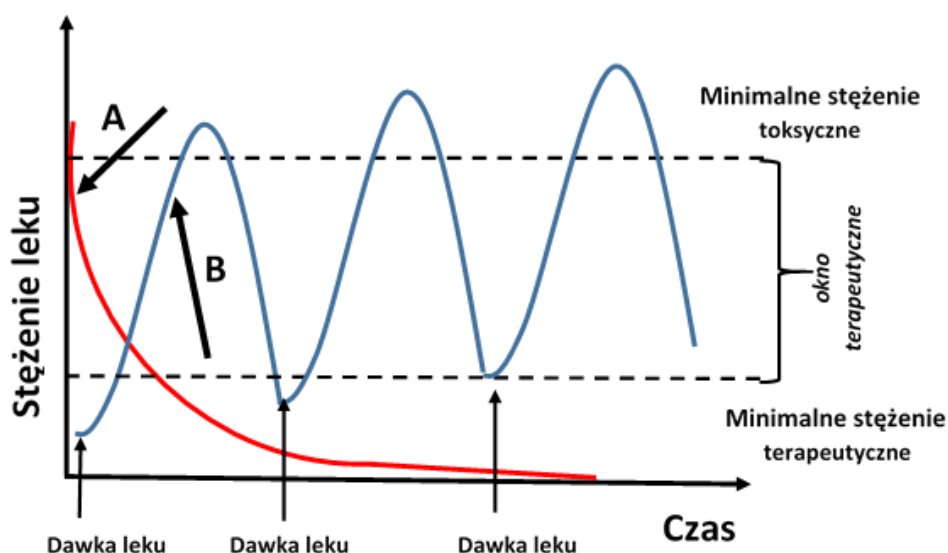
Obecnie stosowane standardowe metody podawania leków zarówno doustne jak i iniecyjne nie wykorzystują w pełni swoich możliwości terapeutycznych. Głównym problemem jest fakt dystrybucji leku w obrębie całego organizmu, co zmniejsza szanse na dotarcie odpowiedniej dawki leku do miejsca docelowego i zarazem wymusza stosowanie dużo większych dawek początkowych przyjmowanego leku. Może to powodować niekorzystne uboczne skutki terapii w postaci niszczenia zdrowych komórek organizmu.

Jednym z celów współczesnej technologii postaci leku jest udoskonalanie farmaceutyków w taki sposób, aby docierały bezpośrednio do miejsca chorobowego. Wówczas początkowa/przyjmowana dawka leku mogłaby zostać ograniczona i zminimalizowane byłyby toksyczne skutki jego działania na zdrowe tkanki [1]. Wśród różnych sposobów realizacji tego celu jest między innymi zastosowanie nośników leków. Odpowiednie nośniki leków zwiększają prawdopodobieństwo dostarczenia leku w miejsce przeznaczenia, eliminują dystrybucję leku w całym organizmie oraz umożliwiają jego ciągle i przedłużone uwalnianie. Ze względu na to, możliwe jest utrzymanie stałego terapeutycznego stężenia leku przy jednoczesnym zmniejszeniu startowej dawki podawanego medykamentu [2]. Nośniki leków mogą pełnić również funkcję ochronną dla dostarczanych substancji zwiększając ich czas życia w środowisku fizjologicznym. Dzięki nośnikom leków możliwe jest dostarczanie specyficznych przeciwciał, białek czy oligonukleotydów eliminując ich degradację przez czynniki środowiskowe i enzymy [3]. Kolejną zaletą ich stosowania jest również polepszenie właściwości farmakokinetycznych, a zwłaszcza biodostępności wielu leków o słabej rozpuszczalności w wodzie i przepuszczalności przez błony komórkowe [4].

W związku z ogromnymi korzyściami stosowania nośników leków, współczesne badania nad nośnikami koncentrują się na syntezie nowych matryc przy wykorzystaniu zarówno substancji organicznych jak i nieorganicznych o pochodzeniu naturalnym bądź syntetycznym. Dzięki interdyscyplinarnemu podejściu do tworzenia nowych systemów dostarczania leków opartych na nowoczesnych metodach łączących ze sobą nanotechnologię, farmację oraz biologię molekularną, możliwe jest opracowanie materiałów o kontrolowanych właściwościach w środowisku fizjologicznym.

2.1. Rola nośników leków

Głównym celem stosowania nośników leków w terapiach leczniczych jest uzyskanie i utrzymanie odpowiedniego stężenia leku na poziomie terapeutycznym w miejscu chorobowo zmienionym. W wyniku standardowego podania leku drogą doustną jego stężenie stopniowo wzrasta, osiąga wartość maksymalną a następnie maleje. Kolejny wzrost stężenia jest obserwowany dopiero po zażyciu następnej dawki leku (Rys. 1, wykres B). Efekt terapeutyczny uzyskuje się po przekroczeniu minimalnego stężenia terapeutycznego i w trakcie utrzymywania się tego stężenia na określonym poziomie zwanym „oknem terapeutycznym”. Przekroczenie dawki leku powoduje, iż znajdujemy się w stężeniu toksycznym, szkodliwym dla komórek zdrowych. Należy zwrócić uwagę, że standardowe sposoby podawania leków wymagają stosowania dużych początkowych dawek i posiadają bardzo wąskie okno terapeutyczne, a stężenie leku na pożądanym poziomie w organizmie utrzymuje się dość krótko. Aby szybko zaobserwować efekt terapeutyczny stosowane jest dożylne podawanie leku, które charakteryzuje się gwałtownym wzrostem stężenia substancji, a następnie szybkim eksponentyjnym spadkiem (Rys. 1. wykres A). Również w tym przypadku stężenie terapeutyczne leku jest utrzymywane w krótkim okresie czasu ze względu na szybką metabolizację substancji leczniczej [5].



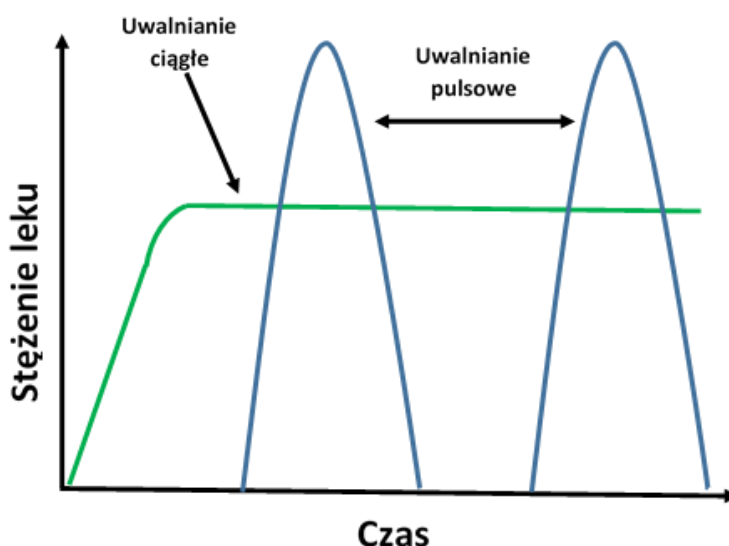
Rys. 1. Przebieg stężenia leku w ustroju podczas podawania (A) dożylnego, (B) doustnego.

Stosowanie nośników leków o kontrolowanej szybkości uwalniania pozwala na zwiększenie długości przebywania substancji leczniczej w oknie terapeutycznym a przez to niesie szereg korzyści dla pacjenta. Dzięki temu zwiększa się efektywność dostarczenia

leku oraz selektywność na konkretne komórki organizmu. Dodatkowo możliwe jest stosowanie dużo mniejszych dawek leku w określonym czasie, co minimalizuje efekty uboczne terapii.

Możemy wyróżnić dwa typy uwalniania leku z nośników. Uwalnianie może zachodzić na sposób ciągły, gdzie po podaniu substancja zawarta w nośniku uwalnia się stopniowo osiągając dawkę terapeutyczną, która utrzymuje się na określonym poziomie przez długi okres czasu. Przykładami nośników o ciągłym uwalnianiu substancji są nośniki polimerowe, które mogą być w postaci kapsułek przyjmowanych doustnie, mikro i nanokapsułek oraz implantów. W tym typie podawania substancji sprawdzają się również hydrożele, z których substancja uwalniania jest z nośnika transdermalnie przy zastosowaniu lipofilowych nośników. [6].

Kolejnym sposobem uwalniania leku z nośników jest uwalnianie pulsowe. Metoda ta, w przeciwieństwie do metod o stałym przedłużonym uwalnianiu, dostarcza lek w postaci impulsów w zmiennych przedziałach czasu. Dostarczanie leku w ten sposób jest preferowane przez organizm ludzki ze względu na podobieństwo mechanizmu wydzielania hormonów czy neuroprzekaźników. Tego typu podawanie leku z nośnika sprawdza się dobrze przy terapiach hormonalnych, gdzie zastosowanie ciągłego dostarczania leków mogłoby mieć negatywne skutki dla organizmu poprzez hamowanie naturalnej sekrecji hormonów. Na rysunku 2 zostały przedstawione przykładowe profile uwalniania substancji czynnej z nośnika o mechanizmie ciągłym i pulsowym [7].



Rys. 2. Porównanie przykładowych profili uwalniania leku z nośników w postaci ciągłej i pulsacyjnej.

Projektowanie nośników leków jest uzależnione od wielu czynników i stanowi duże wyzwanie dla naukowców. Należy zwrócić uwagę na materiał, z którego syntezowany jest nośnik, aby był biokompatybilny i nie powodował cytotoksyczności komórek zdrowych. Ważna jest również zdolność do akumulacji leku oraz stabilność leku w danym nośniku. Warto sprawdzić również jego właściwości mechaniczne oraz możliwość kontroli uwalniania leku pod wpływem warunków zewnętrznych. Kolejnym aspektem jest również efekt degradacji środowiskowej nośnika, który ułatwia uwalnianie leku jak i powoduje łatwiejsze usuwanie pozostałości nośnika z organizmu [8].

Obecnie dużym zainteresowaniem cieszą się nośniki, które docierają bezpośrednio do miejsca chorobowego, gdzie lek zostaje uwalniany. Tego typu koncepcję, jako pierwszy zaproponował Paul Erlich porównując lek do „magicznego pocisku”, który trafiałby z wysoką precyzją w cel i niszczył go bez ingerencji w jego otoczenie [9]. Nośniki leków wykorzystujące efekt naprowadzania najczęściej stosuje się w leczeniu nowotworów stosując tzw. terapię celowaną (ang. *targeted therapy*) [10].

Idealny nośnik leku w terapii celowanej powinien spełniać następujące cechy:

- być biochemicznie obojętny (nietoksyczny),
- nie powinien powodować swoistej odpowiedzi immunologicznej organizmu,
- być stabilny fizycznie i chemicznie w warunkach *in vivo* i *in vitro*,
- mieć kontrolowaną i przewidywalną szybkość uwalniania,
- posiadać odpowiednią terapeutyczną dawkę ,
- mieć minimalny poziom nieszczelności,
- być biodegradowalny, aby ułatwić eliminację z ustroju,
- być łatwym w przygotowaniu i relatywnie tanim w produkcji.

2.2. Rodzaje transportu nośników leków w ustroju

Wyróżniamy dwa mechanizmy dostarczania leków zawartych w nośnikach: aktywny i bierny. Bierne dostarczanie leków (ang. *passive targeting*) wykorzystywane jest szczególnie w terapii przeciwnowotworowej ze względu na anatomiczną strukturę tkanki guza nowotworowego [11]. Związane jest to z tym, iż tkanki nowotworowe w przeciwieństwie do zdrowych charakteryzują się obecnością nieszczelnych naczyń krwionośnych, które umożliwiają przenikanie małych cząsteczek leku do wnętrza guza. Średnica szczelin w tkankach nowotworowo zmienionych wynosi między 100-800 nm natomiast w tkankach zdrowych jedynie około 2-6 nm [12]. To bierne zjawisko

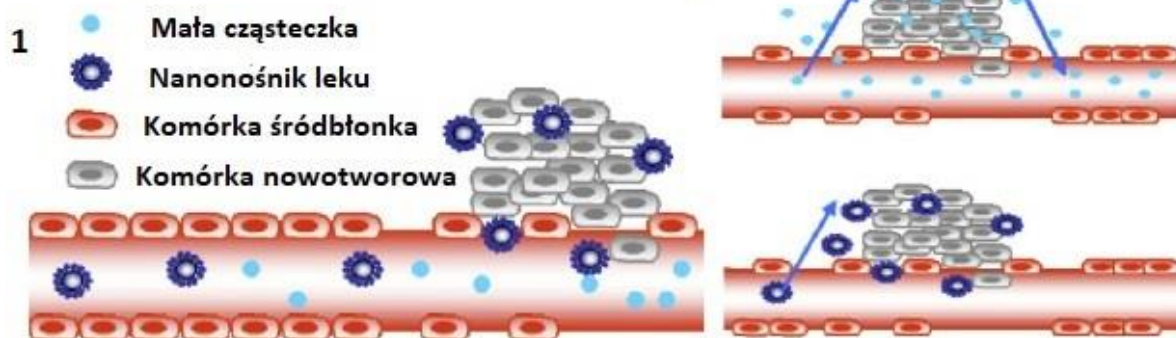
przenikalności naczyniowej nosi nazwę efektu EPR (ang. *Enhanced Permeability and Retention effect*) [13]. Ze względu na ten efekt ważne jest, aby nośniki leków posiadały odpowiedni rozmiar pozwalający na penetrację wnętrza tkanek guza nowotworowego a uniemożliwiający wnikanie do komórek zdrowych.

Transport bierny może zachodzić na drodze konwekcji bądź biernej dyfuzji. Konwekcja dotyczy ruchu cząstek w obrębie płynu i jest dominującym typem transportu dla większości dużych cząsteczek. Natomiast związki o małej masie cząsteczkowej takie jak np. tlen transportowane są głównie przez dyfuzję. Jednakże w obrębie tkanek nowotworowych konwekcja jest słaba ze względu na nadciśnienie śródmiąższowe tkanek nowotworowych. Ostatecznie wnikanie cząsteczek do wnętrza guza kontrolowane jest głównie przez procesy dyfuzyjne [14].

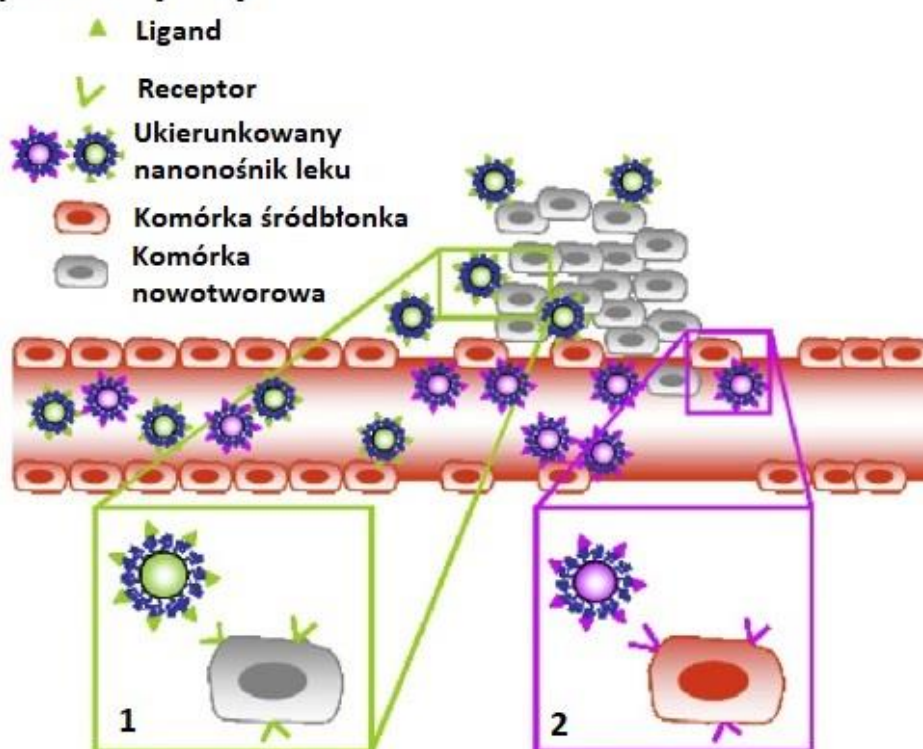
Drugim typem transportu leku w środowisku fizjologicznym jest transport aktywny (ang. *active targeting*). W tym typie transportu wykorzystywane są specyficzne właściwości naprowadzające nośników, które pozwalają dotrzeć bezpośrednio do miejsca docelowego [15]. Nośniki modyfikowane są ligandami, które wiążą się z wysokim powinowactwem z receptorami lub antygenami komórek docelowych. Ligandy są tak dobierane, aby wiązały się z receptorami, które ulegają nadekspresji w okolicy komórek nowotworowych, a omijały receptory komórek zdrowych. Do modyfikacji nośników aktywnego transportu najczęściej stosuje się swoiste przeciwciała, peptydy, cukry, białka bądź aptamery. Najbardziej preferowane są małe ligandy ze względu na większą stabilność w warunkach fizjologicznych i brak immunotoksyczności [16,17].

Zastosowanie aktywnego transportu skutkuje zwiększonym stężeniem leku w obrębie chorobowo zmienionych tkanek bądź miejsc zapalnych w organizmie. Powoduje to zmniejszenie efektów ubocznych terapii i uniemożliwia szybkie wypłukiwanie leku do krwioobiegu [18].

A Transport bierny



B Transport aktywny



Rys. 3. Rodzaje transportu nośników leków w organizmie (A) - transport bierny związany ze zwiększoną przepuszczalnością naczyniową. (1) Transport nanonośników do komórek nowotworowych przez nieszczelne naczynia krwionośne (2) Schematyczne przedstawienie wpływu wielkości cząstek na akumulację w tkance guza nowotworowego (B) - transport aktywny. Ligandy na powierzchni nanonośników wiążą się z receptorami na powierzchni: (1) komórek nowotworowych, (2) angiogennych komórek śródbłónka [19].

2.3. Rodzaje nośników leków

Najnowsze prace w dziedzinie inżynierii materiałowej skupiają się na projektowaniu i syntezie nośników leków o określonych właściwościach, które będą biogodne, stabilne w środowisku fizjologicznym i zapewnią ochronę substancji aktywnej w nim zawartej przed

degradacją. Dlatego też wybór materiału, z którego będą wykonane jest niezwykle ważny. Rodzaj materiału nośnika wpływa na jego kształt, rozmiar, ładunek, efektywność enkapsulacji leku jak i również na kinetykę jego uwalniania.

Do wytwarzania nośników leków stosuje się różne rodzaje związków, w tym: związki nieorganiczne, struktury lipidowe, polimery, związki organiczne i cząstki biologiczne. Do tej pory powstało wiele różnych form nośników. Są to między innymi: nanocząstki, kapsułki, dendrymery, liposomy, micelle, nanorurki, kropki kwantowe i nanożele.

2.3.1. Nośniki leków utworzone z nieorganicznych związków

Nieorganiczne nośniki leków są zazwyczaj zbudowane z metali takich jak: srebro, złoto, żelazo oraz z tlenków metali. Mogą one występować w postaci nanocząstek, nanoprętów, nanoklatek czy też innych nieregularnych form. Najczęściej występują jednak w postaci nanocząstek. Mogą przybierać formy jednolite bądź typu rdzeń-otoczka.

Szczególnym zainteresowaniem naukowców cieszą się nanocząstki złota. Nanostruktury złota są atrakcyjne, ze względu na ich niską toksyczność, immunogenność, relatywnie łatwą syntezę chemiczną oraz duże możliwości modyfikacji ich powierzchni [20]. Ich ważną właściwością jest występowanie rezonansu plazmonów powierzchniowych (ang. *surface plasmon resonance*), czyli drgań chmury elektronowej powodujących zmianę energii świetlnej na cieplną. Ta właściwość złota jest ściśle zależna od kształtu i wielkości jego nanocząstek i może być wykorzystywana w terapii hipertermicznej i fotodynamicznej nowotworów [21,22]. Dzięki ujemnemu ładunkowi powierzchniowemu i wysokiej reaktywności, nanocząstki złota można funkcjonalizować lekami bądź ligandami, co daje duże możliwości wykorzystania ich do celowanych terapii medycznych. Najczęściej są one modyfikowane poprzez pokrycie warstwą polimerów takich jak PEG, które umożliwiają lepszą internalizację i łączenie się z komórkami [23]. Modyfikacje poliglikolem etylenowym umożliwiają przyłączenie do nanocząstek złota różnych biomolekuł, takich jak: biotyna, laktoza, lecytyna oraz inne białka czy oligonukleotydy [24,25].

Modyfikowanie nanocząstek złota aminokwasami i peptydami umożliwia wykorzystanie aktywnego transportu i rozpoznanie miejsca docelowego przez nośnik. Aminokwasy ze względu na obecność dodatnich grup aminowych wiążą się elektrostatycznie z ujemnie naładowanymi grupami fosforanowymi DNA z większą skutecznością, co zostało również wykorzystane do dostarczania genów w terapii genowej i wyeliminowania efektu toksyczności [26]. Wykorzystanie odpowiednich peptydów takich jak CALNNR umożliwiło celowanie w elementy wewnątrzkomórkowe. Nanocząstki zmodyfikowane tym rodzajem

peptydu mogły skutecznie przeniknąć przez błonę komórkową i wykazywały wyższe powinowactwo do DNA, RNA jak i również retikulum endoplazmatycznego w komórce [27]. Innym sposobem jest dołączenie specjalnych sekwencji oligonukleotydów zwanych aptamerami, które mają powinowactwo do danego receptora lub białka, na które są nakierowywane. Przykładowo, do modyfikacji nanocząstek złota użyto aptameru PSMA, który nakierowuje się na komórki raka gruczołu krokowego. Uzyskane nośniki wykazywały zmniejszoną toksyczność ogólnoustrojową i powodowały znaczną redukcję guza nowotworowego [28,29].

Innym rodzajem nośników a zarazem narzędziem do obrazowania i wykrywania nowotworów są kropki kwantowe (ang. *quantum dots* - *QDs*). Są to najczęściej sferyczne nanokryształy o rozmiarach od 2 do 20 nm. Zbudowane są z pierwiastków grup III i IV, II i VI lub IV i VI układu okresowego [30,31]. Ich właściwości są pośrednie między półprzewodnikami a cząstkami kwantowymi. Podobnie jak półprzewodniki, kropki kwantowe pochłaniają fotony światła o energii pozwalającej na przeniesienie elektronów z poziomu niewzbudzonego (atomowego) na wyższy wolny poziom energetyczny w paśmie przewodnictwa. Przejście odwrotne elektronów związane jest z emisją promieniowania elektromagnetycznego, której długość fali zależy od rozmiaru i składu pierwiastkowego QDs. Nanokryształy o małej średnicy (2 nm) cechują się fluorescencją o długości fali odpowiadającej światłu niebieskiemu. Wraz ze wzrostem średnicy kropek kwantowych długość fali promieniowania emitowanego rośnie przechodząc przez zakres światła widzialnego, a kończąc na promieniowaniu podczerwonym [32].

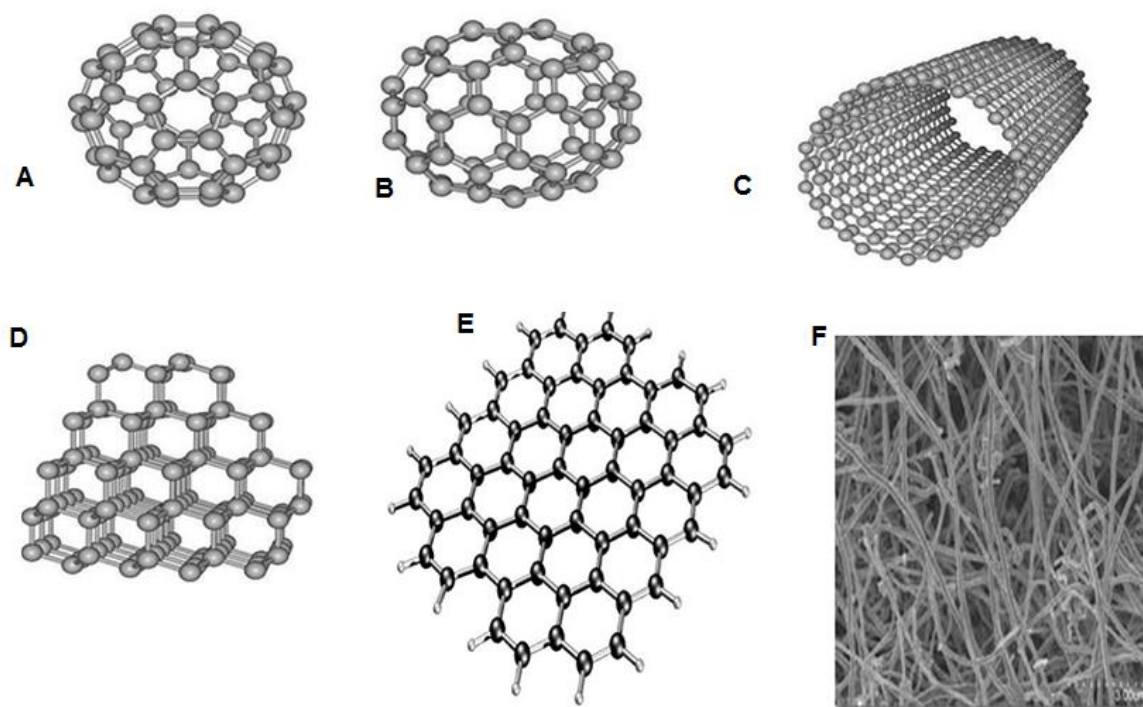
Do otrzymywania kropek kwantowych stosuje się głównie nieorganiczne siarczki, selenki i tlenki, takie jak: CdS, CdSe, ZnS i TiO₂. Kropki kwantowe składają się z centralnie umieszczonych półprzewodnikowych nanokryształów i warstwy ochronnej, którą stanowi zazwyczaj ZnS. Warstwa ochronna dodatkowo może być modyfikowana przez polimery, które chronią przed działaniem enzymów i hydrolizą w środowisku fizjologicznym. Do zewnętrznej otoczki kropek kwantowych przyłącza się często różnego typu ligandy takie jak: kwasy nukleinowe, białka oraz przeciwciała pełniące funkcję nakierowującą na określone struktury w organizmie [33].

Nośniki leków w postaci kropek kwantowych ze względu na swoje właściwości emisyjne dają możliwość monitorowania i dystrybucji substancji leczniczej w organizmie. Nanokryształy modyfikowane odpowiednimi ligandami wykorzystywane są do badania powierzchni komórek oraz struktur wewnątrzkomórkowych. Ich fotostabilność umożliwia długotrwałe monitorowanie znakowanego elementu. Pomimo wielu zalet i szerokiego

stosowania w biomedycynie kropki kwantowe nie są pozbawione wad. Poważnym problemem jest toksyczność jonów metali ciężkich budujących warstwę wewnętrzną QDs. Powstało wiele rozwiązań eliminujących toksyczne działanie rdzenia kropek kwantowych jednak rozwiązania te nie są wystraszające. Należy dalej rozwijać nowe metody syntezy i modyfikacji kropek kwantowych, aby ograniczyć efekt toksyczności i zwiększyć ich aplikacyjność we współczesnej biomedycynie [34].

Kolejny rodzaj nieorganicznych nośników leków stanowią porowate nanocząstki z tlenku tytanu, tlenku glinu oraz krzemionki [35,36]. Ich porowata struktura ułatwia akumulację leków wewnątrz porów. Mogą występować w różnych postaciach, np.: kulistej, sferycznej, struktur hierarchicznych i nanowłókien. Ich właściwości zależą ściśle od ich pola powierzchni, średnicy porów jak i również rodzaju mezostuktury (heksagonalna, lamelarna, sześcienna). Pierwszy mezoporowaty nośnik na bazie krzemionki został wykorzystany do dostarczania leku przeciwbólowego - ibuprofenu [37]. Wprowadzono go do nanocząstek krzemionkowych typu MCM-41. Badano wpływ parametrów strukturalnych na ilość i szybkość uwalniania leku. Badania te wykazały, że struktura, topologia jak i również powierzchnia mezofilowych nanocząstek krzemionki wpływają bezpośrednio na szybkość ładowania i szybkość uwalniania *in vitro* ibuprofenu. Natomiast wielkość porów nie wpływa znacząco na szybkość uwalniania leku.

Ważną grupę nośników stanowią materiały węglowe. Do tej pory zsyntezowano szereg nanomateriałów opartych na węglu o różnorodnych morfologiach i mikrostrukturach takich jak: nanorurki węglowe [38, 39], fullereny [40], grafen [41], nanodiamenty [42], nanowłókna [43] jak i również różnego typu struktury hybrydowe [44]. Materiały te przyciągają uwagę naukowców ze względu na szereg zalet takich jak: wysoka odporność mechaniczna związana ze zwartą budową, małe wymiary ułatwiające wejście do komórki, dobre właściwości przewodzące oraz duża powierzchnia umożliwiająca modyfikację lekami bądź ligandami. Wszystkie te zalety świadczą, iż materiały węglowe posiadają duży potencjał jako systemy dostarczania leków [45]. Rodzaje nanomateriałów węglowych używanych do konstrukcji nośników leków zostały przedstawione na rysunku 4.



Rys. 4. *Formy występowania materiałów węglowych użytecznych jako nośniki leków (A) fulleren C_{60} , (B) fulleren C_{70} , (C) nanorurki węglowe, (D) nanodiamenty, (E) grafen, (F) nanowłókna [46].*

Najczęściej stosowanymi nośnikami węglowymi są nanorurki węglowe (ang. *carbon nanotubes* CNT). Stanowią one alotropową odmianę węgla o postaci walców o średnicy rzędu nanometrów, powstałych ze zwiniętej płaszczyzny grafenu. Ze względu na ilość warstw budujących ścianę nanorurki, dzielimy je na nanorurki jednościenne (SWNT), dwuścienne (DWNT) oraz wielościenne (MWNT). Nanorurki jednościenne składają się z pojedynczej płaszczyzny grafenowej, która zbudowana jest z sieci heksagonalnej oraz dwunastu pierścieni pentagonalnych. Wśród nanorurek węglowych charakteryzują się największą homogenicznością oraz najmniejszą liczbą defektów sieci. Natomiast nanorurki dwuścienne, ze względu na swoją budowę tworzoną przez dwa zwinięte współosiowo cylindry, cechują się lepszą sztywnością w porównaniu z nanorurkami jednościennymi. Z kolei nanorurki wielościenne skonstruowane są z wielu koncentrycznie ułożonych cylindrów ułożonych w równomierny sposób. Odległości pomiędzy kolejnymi cylindrami są stałe i wynoszą około 0,34 nm. Jednak wartość ta może nieznacznie ulegać zmianie ze względu na powstające defekty sieciowe [47].

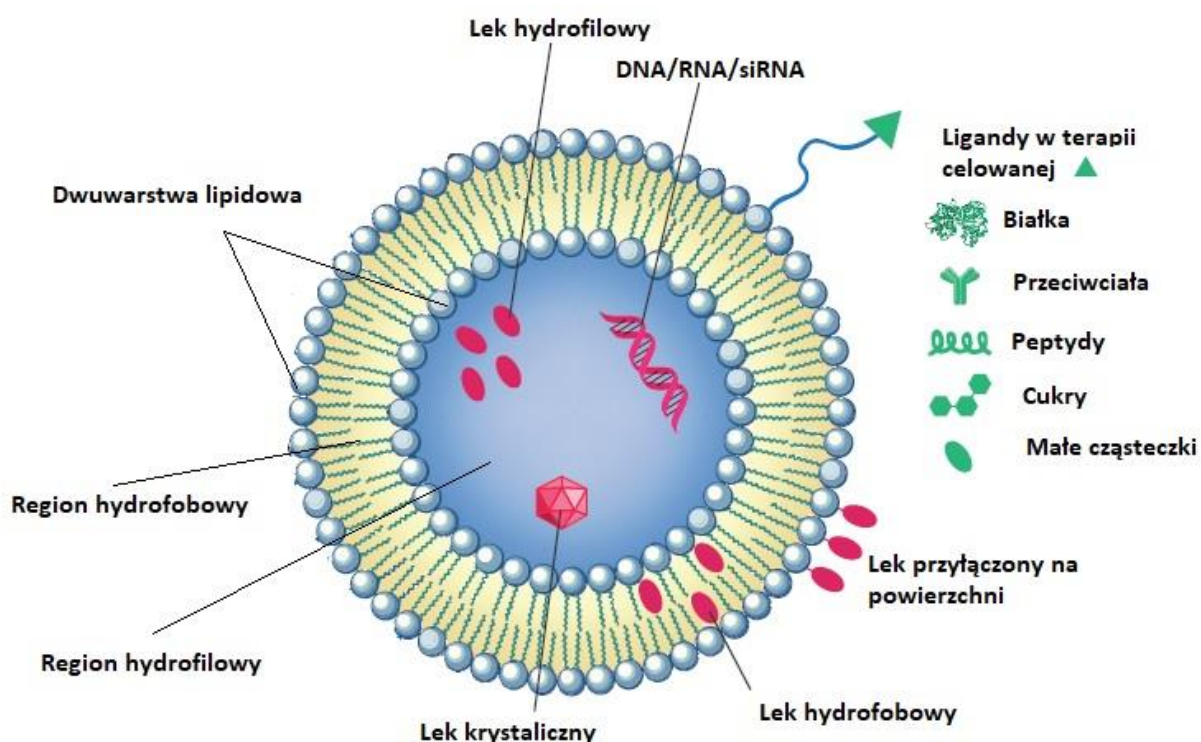
Nanorurki węglowe, aby pełniły rolę nośników leków, są funkcjonalizowane różnego typu substancjami biologicznymi i ligandami. Modyfikacja powierzchni nanorurek jest możliwa ze względu na dużą dostępność miejsc wiązania substancji aktywnej na heksagonalnej

siatce atomów węgla. Możemy wyróżnić dwa rodzaje funkcjonalizacji CNT: endohedralną i egzohedralną [48]. Funkcjonalizacja endohedralna polega na przyłączaniu substancji do pustych rdzeni nanorurki, z kolei funkcjonalizacja egzohedralna polega na zewnętrznych modyfikacjach powierzchni nanorurki za pomocą wiązań kowalencyjnych bądź oddziaływań niekowalencyjnych. Funkcjonalizacja nanorurek stabilizuje ich strukturę, zwiększa ich biokompatybilność i zwiększa możliwość przenikania przez błony komórkowe [49]. Nanorurki MWNT wykorzystywano między innymi do dostarczania leków przeciwnowotworowych cis-platyny i doksorubicyny. W obu przypadkach otrzymano obiecujące wyniki i zahamowanie wzrostu komórek nowotworowych [50,51].

Pomimo przedstawionych powyżej zalet, nanocząstki nieorganiczne, jako nośniki leków, posiadają również wady i niedoskonałości. Należy pamiętać, iż często wykazują one cytotoksyczność i akumulację w organizmie ludzkim, co może prowadzić do przewlekłych stanów zapalnych tkanek. Mogą również powodować uszkodzenia błon komórkowych i mitochondriów, a w szczególności komórek śródbłona [52]. Istnieją publikacje wykazujące cytotoksyczny charakter nanocząstek złota, które w konsekwencji powodowały hemolizę i powstawanie skrzepów krwi [53]. Natomiast szeroko stosowane nanorurki mogą powodować agregację płytek krwi [54]. Z kolei nanocząstki na bazie krzemionki, obecne w dużych stężeniach, powodowały stres oksydacyjny tkanek poprzez wzrost ilości wolnych rodników i obniżenie poziomu glutationu [55]. Patrząc na powyższe doniesienia należy stwierdzić, że systemy te wymagają dalszego udoskonalenia i kolejnych badań nad ich toksycznymi, ubocznymi efektami w funkcjonowaniu organizmu.

2.3.2. Nośniki leków na bazie lipidów

Wśród różnych preparatów opartych na warstwach lipidowych największą popularnością cieszą się liposomy. Liposomy definiuje się jako pęcherzyki wypełnione roztworem i otoczone podwójną warstwą lipidową. Ich wielkość waha się od 0,01 do 1 μm [56]. Otoczka liposomów posiada skład i strukturę podobną do naturalnych błon biologicznych. Właśnie to podobieństwo do błon biologicznych pozwala liposomom na łatwe przenikanie do wnętrza komórek, co pozwala na wykorzystanie ich jako nośników substancji aktywnych [57]. Liposomy powstają w środowisku wodnym podczas spontanicznego formułowania się dwuwarstwowej struktury posiadającej fragment hydrofilowy jak i hydrofobowy. Taka budowa nadaje im charakter amfifilowy i sprawia, że liposomy są idealnymi nośnikami substancji biologicznie czynnych takich jak: leki, białka oraz kwasy nukleinowe [58]. Struktura liposomu i jej zalety w dostarczaniu leków zostały przedstawione na rysunku 5.



Rys. 5. Schemat budowy strukturalnej liposomu i jego funkcji dostarczania substancji leczniczej w organizmie. Leki w zależności od ich charakteru chemicznego mogą być akumulowane do hydrofilowego wewnętrznego kanału, wbudowane w dwuwarstwę lipidową bądź sprzężone z powierzchnią liposomu. Możliwa jest także dodatkowa modyfikacja powierzchni ligandami w celu związania nośnika w miejscu docelowym[59].

Liposomy pod względem składu, właściwości fizykochemicznych oraz mechanizmu dostarczania dzielimy na [60]:

- konwencjonalne – zbudowane z naturalnych fosfolipidów. Liposomy te charakteryzują się krótkim czasem życia w krwioobiegu. W krwioobiegu są narażone na kontakt z białkami i komórkami, które zapobiegają ich dotarciu do miejsc docelowych [61].
- kationowe – zawierają substancje amfifilowe z grupą hydrofilową o charakterze kationowym. Okazały się efektywne, jako nośniki kwasów nukleinowych. Nie wykazują selektywnej akumulacji w komórkach docelowych, ulegają fuzji z komórkami dostarczając materiał genetyczny do ich wnętrza [62].
- sferycznie stabilizowane – są to liposomy dodatkowo stabilizowane przez przyłączenie hydrofilowego polimeru do powierzchni zewnętrznej. Polimerowa bariera przeciwdziała interakcji liposomów z komponentami komórkowymi w środowisku fizjologicznym [63],

- immunoliposomy - do ich powierzchni zewnętrznej przyłączone są przeciwciała lub ich fragmenty w celu zwiększenia selektywności i dotarcia do miejsca docelowego. Liposomy tego typu szybko opuszczają krwioobieg i gromadzą się w śledzionie i wątrobie [64].
- niosomy - zbudowane z niejonowych związków amfifilowych. Tworzone są ze związków powierzchniowo czynnych pozbawionych ładunku. Budują je substancje chemiczne takie jak: eter etylowy polioksyetyloglikolu, eter poligliceryloalkilowy oraz ester kwasu stearynowego. Są trwalsze pod względem chemicznym [65].

Zastosowanie liposomów, jako biodegradowalnych i biokompatybilnych nośników pozwala zredukować toksyczność zawartych w nich terapeutyków. Dzięki ich wprowadzeniu możliwe jest zmniejszenie efektów ubocznych terapii leczniczych poprzez zapobieganie agregacji i gromadzenia się leków w zdrowych tkankach. Dodatkowo pełnią one funkcję ochronną dla zawartych w nich substancji i zapobiegają degradacji w środowisku fizjologicznym. Możliwa jest również łatwa modyfikacja ich rozmiaru, ładunku jak i również składu błony fosfolipidowej, co pozwala na zwiększenie selektywności dostarczania substancji leczniczej. Ponadto liposomy można sprzęgać z przeciwciałami bądź innego typu ligandami w celu zwieszenia selektywności działania na konkretne tkanki w organizmie [63, 66].

2.3.3. Polimerowe nośniki leków

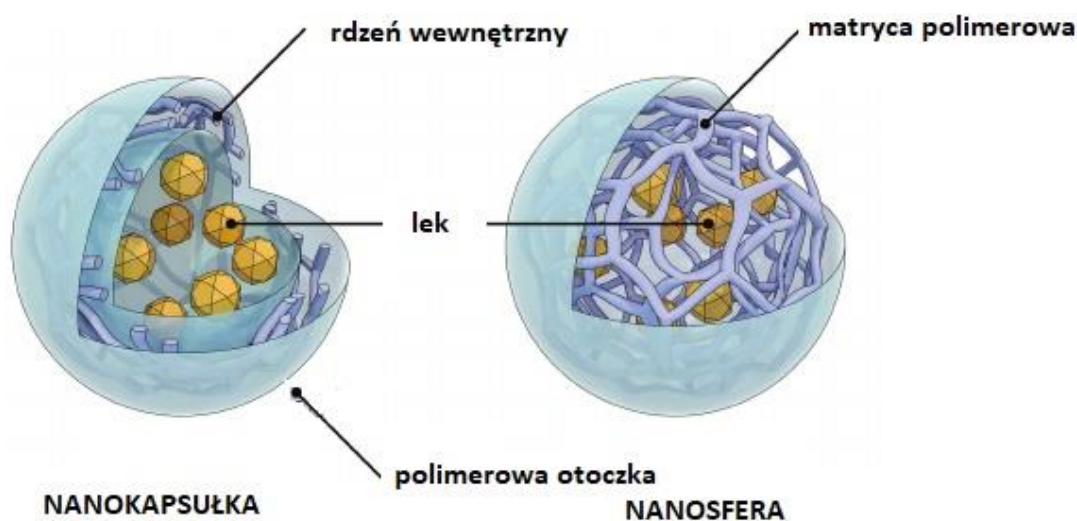
Polimerowe nośniki leków ze względu na swoje specyficzne właściwości oraz biokompatybilność posiadają duży potencjał w dziedzinie dostarczania leków. W przeciwieństwie do nieorganicznych nośników leków, większość nośników polimerowych posiada możliwość biodegradacji, co zapobiega ich akumulacji w organizmie i ułatwia ich usuwanie [67].

Nośniki leków zbudowane są z syntetycznych bądź naturalnych łańcuchów polimerowych. Najczęściej stosowane polimery syntetyczne to: kopolimery kwasu poliglikolowego i polimlekowego (PLGA), poliglikolu etylenowego (PEG) i kwasu polimlekowego (PLA) oraz polimetakrylanów metylu (PMMA). Natomiast wśród polimerów naturalnych najbardziej popularne to: alginian, chitosan, hialuronian oraz albuminy [68]. Polimerowe nośniki mogą mieć różne mechanizmy uwalniania leków w zależności od materiału budującego ich strukturę. A więc mamy polimery uwalniające lek w wyniku dyfuzji, w wyniku pęcznienia, na skutek degradacji chemicznej i enzymatycznej oraz z powodu zmian strukturalnych wywołanych zmianą warunków środowiskowych. Ten ostatni typ polimerów jest nazywany polimerami inteligentnymi (ang *smart polymers*), gdyż lek uwalniany jest na skutek zmiany czynników

takich jak pH, temperatura, moc jonowa i potencjał redox [69]. W zależności od budowy polimeru oraz metody wytwarzania polimerowe nośniki leków mogą występować pod postacią nanocząstek, miceli oraz dendrymerów.

2.3.3.1. Nanocząstki polimerowe

Nanocząstki polimerowe są nośnikami o rozmiarze poniżej 1000 nm. Składają się z biokompatybilnych i/lub biodegradowalnych polimerów naturalnych bądź syntetycznych. [70]. Przyjmują postać charakterystycznych nanosfer, gdzie substancja aktywna rozproszona jest wewnątrz sieci polimerowej, bądź nanokapsulek, gdzie substancja aktywna jest umiejscowiona w rdzeniu otoczonym powłoką (ang. *core-shell*). Nanocząstki posiadające strukturę rdzeń-powłoka składają się z hydrofobowych i hydrofilowych łańcuchów polimerowych. Najczęściej rdzeń składa się z gęstej matrycy polimerowej, w której może być nagromadzony lek i hydrofilowej powłoki zapewniającej stabilność w warunkach fizjologicznych. Na rysunku 6 przedstawiono różnicę między nanocząstkami sferycznymi i nanokapsułkami [71].



Rys. 6. Schematyczne przedstawienie struktury nanokapsułki i nanosfery polimerowej [71].

Rodzaj polimeru budującego nanocząsteczkę silnie wpływa na jej właściwości. Polimery budujące nanonośniki muszą spełniać szereg warunków; muszą być chemicznie obojętne, nietoksyczne, biokompatybilne i stosunkowo łatwe do otrzymania w syntezie chemicznej [67].

Możliwe jest również fizyczne bądź chemiczne absorbowanie leku bądź ligandu na powierzchni nanocząstek. Często modyfikuje się nanocząstki polimerowe poliglikolem

etylenowym (PEG); przeciwdziała to swoistej odpowiedzi immunologicznej organizmu oraz fagocytozie. Z kolei modyfikacje ligandami, przeciwciałami i białkami umożliwiają dotarcie nośnika do molekularnego celu i zwiększają jego selektywność [72,73].

2.3.3.2. Micele polimerowe

Micele polimerowe są to sferyczne nanostruktury o rozmiarach od 10 - 100 nm składające się z amfifilowych polimerów, które ulegają samoorganizacji w środowisku wodnym. Bloki hydrofilowe tworzą zewnętrzną otoczkę miceli natomiast bloki hydrofobowe rdzeń. Tworzenie się miceli w wodzie następuje po przekroczeniu pewnego stężenia polimerów tzw. krytycznego stężenia micelizacji (CMC). Czynniki wpływającymi na proces powstawania miceli są wielkość domeny hydrofobowej, stężenie amfifilu, temperatura i rozpuszczalnik. Wielkość polimerowych miceli można łatwo kontrolować poprzez odpowiedni dobór masy cząsteczkowej amfifilowego kopolimeru blokowego oraz zmianę względnego udziału łańcuchów hydrofobowych i hydrofilowych [74,75,76].

Ważny jest odpowiedni wybór polimerów budujących struktury micelarne. W zależności od budowy rdzenia miceli możliwe jest uzyskanie nośników o różnego typu właściwościach. Przykładowo, micele zbudowane z poli(L-aminokwasów) charakteryzują się czułością na pH, co pozwala na kontrolowane uwalnianie leku w zmiennych warunkach środowiskowych. Najczęściej stosowanym polimerem hydrofilowym budującym micele jest glikol polietylenowy (PEG), który przeciwdziała zjawisku opsonizacji i wydłuża czas przebywania nośnika w ustroju [77,78].

Zaletą micelarnych nośników leków jest zdolność do efektywnej akumulacji leków lipofilowych i hydrofobowych. Pozwala to na wykorzystanie w terapiach leków o słabej rozpuszczalności i biodostępności [79]. Podczas tworzenia się miceli możliwe jest jednoczesne zamknięcie substancji aktywnej w hydrofobowym rdzeniu, co skutkuje redukcją toksycznego działania leku na zdrowe komórki. Dzięki swojej strukturze micele polimerowe są dobrymi nośnikami leków takich jak: doksorubicyna, antybiotyki antracyklinowe, docetaksel, paklitaksel, tamoksifen, diazepam, jak i również witamin [80,81,82,83,84]. Micele polimerowe wykazują znikomą cytotoksyczność, a ich powłoka hydrofilowa i mały rozmiar zapobiegają mechanizmom filtracyjnemu w śledzionie, co przedłuża ich czas życia w krwioobiegu.

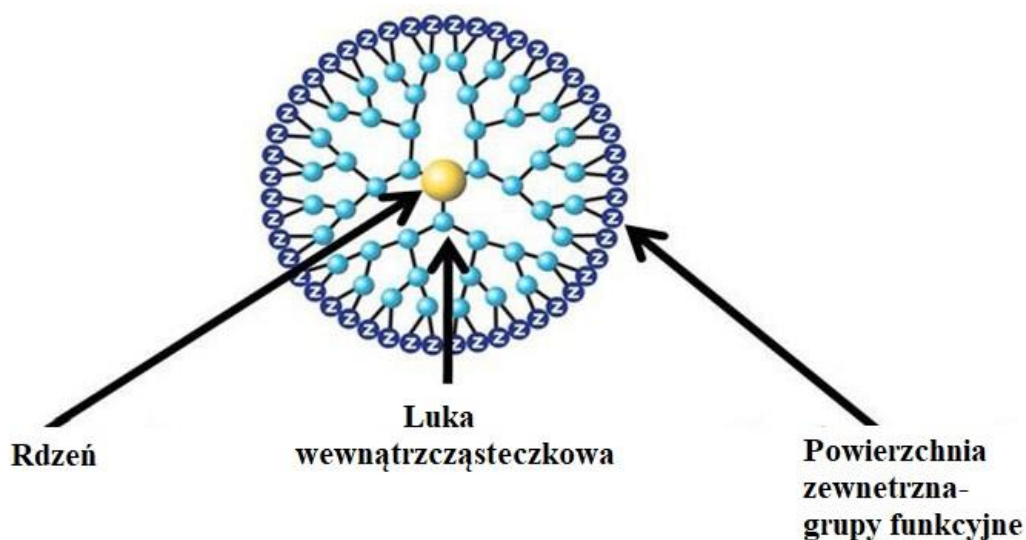
Uwalnianie leku z miceli może odbywać się w wyniku różnych mechanizmów ściśle związanych z krytycznym stężeniem micelizacji. W przypadku, gdy stężenie miceli jest wyższe niż wartość CMC, występuje dyfuzyjny mechanizm uwalniania substancji. Natomiast, gdy stężenie miceli jest niższe niż CMC, lek uwalnia się w wyniku dezorganizacji struktury micelarnej nośnika. W przypadku użycia polimerów inteligentnych do konstrukcji struktury

micelarnej, możliwe jest również uwalnianie substancji leczniczej pod wpływem działania bodźców środowiskowych takich jak: temperatura, pH i moc jonowa [85].

Dodatkowo, tak jak inne nośniki, micle można modyfikować powierzchniowo ligandami nakierowującymi na odpowiednie receptory. Funkcjonalizacja kopolimerów blokowych tworzących micelę cukrami, peptydami czy przeciwciałami, zmienia ich funkcje biologiczne i pozwala na aktywny transport do miejsca docelowego [86].

2.3.3.3. Dendrymery

Dendrymery są nową klasą związków polimerowych posiadających rozgałęzioną trójwymiarową strukturę i nanometryczny rozmiar. W przeciwieństwie do klasycznych polimerów mają ściśle określoną strukturę i są homogeniczne w swojej masie cząsteczkowej [87]. Zbudowane są z rdzenia, rozgałęzionego wnętrza i powierzchni zewnętrznej, na której znajdują się różne grupy funkcyjne. Dzięki obecności grup funkcyjnych dendrymery można dowolnie modyfikować poprzez różnego typu podstawniki zmieniając ich właściwości fizykochemiczne. Ze względu na rodzaj grup funkcyjnych obecnych na ich powierzchni, dendrymery dzielimy na: połówkowe, zakończone grupą karboksylową i całkowite, posiadające grupy aminowe lub hydroksylowe [88]. Dodatkowo, dzięki obecności w nich wolnych przestrzeni wewnątrzcząsteczkowych, możliwe jest niekowalencyjne związanie w ich wnętrzu małych cząsteczek. Struktura dendrymerycznego nośnika leku została przedstawiona na rysunku 7.



Rys. 7. Budowa strukturalna dendrymeru polimerowego [89].

Najczęściej stosowanymi polimerami do syntezy dendrymerów są poliamidoaminy (PAMAM), poliaminy, poliamidy, karbokrzemiany i poliestry. Dendrymery poliamidowe

składają się zazwyczaj z rdzenia w postaci amoniaku bądź etylenodiaminy, do którego są przyłączone cząsteczki akrylanu metylu i etylenodiaminy [90,91,92].

W wykorzystaniu dendrymerów, jako nośników substancji leczniczej sprzyja ich budowa wewnętrzna, która umożliwia ochronę substancji aktywnej zawartej w rdzeniu, co zmniejsza jej toksyczność i zwiększa rozpuszczalność. Dzięki umieszczeniu na powierzchni dendrymerów dużej ilości grup aktywnych możliwe jest jednoczesne oddziaływanie ligandów z wieloma centrami aktywnymi. W konsekwencji można zaobserwować synergiczny efekt oddziaływań ligand-receptor, który przewyższa sumę takiej samej ilości poszczególnych oddziaływań; jest to tzw. efekt dendrytyczny [93].

Jednym z pierwszych aplikacyjnych zastosowań dendrymerów było dostarczanie leku przeciwnowotworowego cis-platyny. Do powierzchni dendrymeru PAMAM dołączono cis - platynę, co pozwoliło na uzyskanie koniugatów odznaczających się przedłużonym uwalnianiem leku, większą akumulacją w miejscu guza nowotworowego i mniejszą cytotoksycznością ustrojową w porównaniu do czystej cis-platyny. Inne badania wykazały również dobre powinowactwo tego typu dendrymerów do leków antracyklinowych, takich jak doksorubicyna, metotreksat i ibuprofen [94,95].

3. Hydrożele polimerowe

Hydrożele polimerowe ze względu na swoją budowę posiadają cechy zarówno cieczy jak i ciał stałych. Charakteryzują się dobrymi zdolnościami sorpcyjnymi, biokompatybilnością, relatywnie dużą odpornością chemiczną i wytrzymałością mechaniczną. Posiadają szczególną zdolność do pęcznienia i kurczenia się w środowisku wodnym, bez istotnego, nieodwracalnego naruszenia swojej struktury wewnętrznej. Dzięki swojej budowie wewnętrznej i unikalnym właściwościom zyskały wiele zastosowań w życiu codziennym. Są stosowane między innymi, jako materiały opatrunkowe, stomatologiczne, sensory, superabsorbenty czy elementy implantów medycznych. Ze względu na możliwość dyfuzji cząstek substancji czynnej w ich wnętrzu, są szeroko stosowane jako nośniki leków o kontrolowanym uwalnianiu. Opracowanie nowych nośników leków opartych na hydrożelach jest ściśle związane z syntezą polimerowych sieci modyfikowanych dodatkowymi grupami funkcyjnymi, ligandami czy związkami biologicznie czynnymi, które nadają im nowe właściwości i umożliwiają kontrolę uwalniania substancji czynnej pod wpływem czynników środowiskowych.

3.1. Definicja i rodzaje żeli polimerowych

Żele polimerowe zdefiniowane są, jako jedno lub wieloskładnikowe matryce złożone z trójwymiarowej sieci łańcuchów polimerowych oraz rozpuszczalnika, który wypełnia przestrzeń pomiędzy makromolekułami. Żele wypełnione wodą bądź płynem biologicznym nazywamy hydrożelami [96,97].

Zdolność zatrzymywania wody w strukturze polimerowej jest ściśle związana z obecnością grup hydrofilowych takich jak: aminowa, karboksylowa oraz hydroksylowa. Woda w hydrożelu może stanowić od 40 do 99% suchej masy polimerowej. Pełni ona funkcję transportową dla substancji dyfundujących wewnątrz. Hydrożele występują w postaci wielofazowej: obok fazy krystalicznej występuje faza amorficzna (pęczniejąca) oraz woda [98,99].

Żele polimerowe ze względu na rodzaj oddziaływań między łańcuchami polimerowymi możemy podzielić na: fizyczne i chemiczne [100]. Żele usieciowane fizycznie to żele, które powstają wskutek oddziaływań elektrostatycznych, wiązań wodorowych, oddziaływań *van der Waals'a* oraz innych oddziaływań międzycząsteczkowych. Ten typ hydrożeli cechuje niejednorodna budowa splecionych ze sobą łańcuchów polimerowych. Natomiast hydrożele usieciowane chemicznie charakteryzują się występowaniem kowalencyjnych wiązań chemicznych pomiędzy łańcuchami polimerowymi. Hydrożele te są odporne chemicznie oraz mechanicznie, natomiast ich rozpad jest ściśle związany z nieodwracalnym zniszczeniem sieci polimerowej. Hydrożele zarówno fizyczne jak i chemiczne mogą przyjmować wiele różnych form strukturalnych takich jak: struktury usieciowane, splecione liniowe homopolimery, przenikające się sieci (IPN), liniowe kopolimery oraz kopolimery szczepione [101].

Innym typem klasyfikacji hydrożeli jest rodzaj substancji tworzącej trójwymiarową sieć. Według tego podziału wyróżnia się żele organiczne i nieorganiczne. Żele nieorganiczne zbudowane są zazwyczaj z krzemionki oraz jej pochodnych, natomiast żele organiczne opierają się na polimerach. Z kolei ze względu na rodzaj polimeru budującego nanożele możemy podzielić je na: żele naturalne, powstające z substancji naturalnie występujących w przyrodzie takich jak: polipeptydy, polisacharydy oraz oligonukleotydy, i żele syntetyczne oparte na polimerach zsyntezowanych z pochodnych kwasu akrylowego, metakrylowego oraz akryloamidu [102].



Rys. 8. *Klasyfikacja hydrożeli polimerowych.*

Właściwości hydrożeli użyteczne przy konstrukcji nośników leków to przede wszystkim: ich struktura przestrzenna pozwalająca na chłonięcie dużych ilości rozpuszczalnika i dyfuzję substancji aktywnej wewnątrz sieci, biokompatybilność, podobieństwo do tkanek ludzkich, wysoka odporność fizyczna i chemiczna w warunkach fizjologicznych, często wrażliwość na warunki środowiskowe i biodegradowalność. Ponadto hydrożele charakteryzują się niskim napięciem międzyfazowym, co przeciwdziała absorpcji białek z płynów ustrojowych [103,104].

3.2. Przejście fazowe „inteligentnych żeli polimerowych”

Żele polimerowe, które pod wpływem czynników zewnętrznych ulegają odwracalnej zmianie ich objętości nazywane są „materiałami inteligentnymi”. Mogą występować w dwóch stanach: napęczniałym i skurczonym. Przejście wywołane bodźcem środowiskowym pomiędzy tymi dwoma stanami nazywamy objętościowym przejściem fazowym. Jeżeli punktem wyjścia jest żel napęczniały, podczas zjawiska objętościowego przejścia fazowego następuje usuwanie rozpuszczalnika z polimerowej struktury hydrożelu, co skutkuje drastycznym zmniejszeniem jego objętości. Zjawisko to spowodowane jest zmianą równowagi sił przyciągania i odpychania wewnątrz łańcuchów polimerowych. Wynikiem tej przemiany jest pojawianie się bogatej w polimer fazy skurczonej. Po ustąpieniu działania bodźca, zazwyczaj następuje powrót do

stanu początkowego (napężniałego), co świadczy o tym, iż proces ten jest odwracalny. Przejście fazowe może zachodzić w sposób ciągły w pewnym zakresie zmiany parametru środowiskowego lub w sposób nieciągły poprzez skokową zmianę objętości [105].

Przejście fazowe inteligentnych żeli polimerowych może być wywołane przez szereg bodźców. Bodziec może mieć charakter fizyczny: temperatura, pole magnetyczne i światło, lub chemiczny: pH, siła jonowa, obecność ściśle określonych cząsteczek chemicznych [106].

Przemiana fazowa hydrożeli czułych na temperaturę jest ściśle związana z tzw. dolną krytyczną temperaturą rozpuszczalności (ang. *lower critical solution temperature*, LCST). Poniżej tej temperatury następuje tworzenie się wiązań wodorowych między grupami hydrofilowymi polimeru a cząsteczkami wody, co stabilizuje spęcniałą strukturę żelu. Natomiast po przekroczeniu LCST następuje zwiększenie udziału oddziaływań hydrofobowych i przesunięcie równowagi hydrofobowo-hydrofilowej, co skutkuje zerwaniem wiązań wodorowych i usunięciem wody ze struktury polimerowej hydrożelu (tworzy się stan skurczony). Zjawisko przejścia fazowego może być pomocne podczas uwalniania leku zakumulowanego w wewnętrznej strukturze hydrożelu. W przypadku żeli wrażliwych na temperaturę ważne jest, aby objętościowe przejście fazowe, związane z wyrzuceniem rozpuszczalnika i zakumulowanego w nim leku, następowało w odpowiednim przedziale temperatur. Można tak zaprogramować dany nośnik, aby lek uwalniany był jedynie przy podwyższonej temperaturze (np. leki przeciwgorączkowe) bądź w przypadku nowotworów po nagrzaniu tkanki (tzw. terapia hipertermiczna) [107].

W swojej pracy badawczej skupiłam się głównie na termoczułych hydrożelach zsyntezowanych na bazie akryloamidu (PAM) oraz *N*-izopropyloukryloamidu (PNIPA). Wybrałam te żele, bo ulegają objętościowemu przejściu fazowemu w temperaturze zbliżonej do temperatury ludzkiego ciała. W hydrożelu PNIPA mamy obecne grupy hydrofilowe takie jak: $>NH$ i $>C=O$ i grupy hydrofobowe w postaci łańcucha głównego i grup izopropylowych. Poprzez ustalenie odpowiedniego stosunku monomerów i modyfikację sieci dodatkowymi grupami hydrofilowymi można było uzyskać hydrożele PNIPA o LCST wyższej niż 37° C. Uwalnianie substancji leczniczej z hydrożelowych matryc PNIPA następuje w wyniku zmian temperatury środowiska zewnętrznego i związanej z tym zmiany stanu fazowego hydrożelu [108].

3.3. Hydrożele czule na temperaturę

Hydrożele zmieniające swoją objętość pod wpływem temperatury są szeroko badane przez naukowców pod kątem użyteczności w systemach kontrolowanego uwalniania leków. Wśród tego typu żeli możemy wyróżnić dwa różne rodzaje odpowiedzi na bodziec temperaturowy. Mianowicie pęcznienie pod wpływem wzrostu temperatury jak i kurczenie się pod wpływem wzrostu temperatury. Może występować również połączenie tych dwóch rodzajów przejść polegające na pęcznieniu a następnie kurczeniu się żelu pod wpływem wzrostu temperatury. Rodzaj przejścia fazowego pod wpływem czynnika temperaturowego zdeterminowany jest rodzajem oddziaływań występujących wewnątrz sieci polimerowej.

W hydrożelach pęczniejących pod wpływem wzrostu temperatury występują przede wszystkim oddziaływania *van der Waals'a* i wiązania wodorowe. Podczas wzrostu temperatury następuje wzrost energii ruchów termicznych w stosunku do energii oddziaływań *van der Waals'a* i wiązań wodorowych, co powoduje oddalanie się od siebie łańcuchów polimerowych i w konsekwencji pęcznienie żelu [109].

Natomiast w żelach kurczących się pod wpływem wzrostu temperatury zaczynają dominować oddziaływania hydrofobowe. Gdy zwiększamy temperaturę maleje stopień uporządkowania cząsteczek wody przy jednoczesnym wzroście oddziaływań hydrofobowych i wzroście uporządkowania łańcuchów polimerowych. Jednak sumaryczna entropia w trakcie takiego procesu rośnie i następuje przejście żelu ze stanu spęczniałego w stan skurczony [110].

Żele polimerowe mogą ulegać pod wpływem temperatury przejściom typu zol-żel bądź ulegać objętościowemu przejściu fazowemu polegającemu na zmianie ich objętości a w konsekwencji rozmiaru. W przypadku żeli typu zol-żel po przekroczeniu temperatury LCST następuje tworzenie sztywnej sieci i przejście do stanu żelu. Do tego typu termoczułych polimerów możemy zaliczyć trójblokowy polimer składający się z dwóch bloków politlenku etylenu i jednego bloku politlenku propylenu. Polimer ten w niskiej temperaturze (10 - 25° C) tworzy formę zolu natomiast pod wpływem wzrostu temperatury do temperatury fizjologicznej tworzy formę sztywnego żelu. Innym przykładem jest kopolimer zbudowany z glikolu polietylenowego i kopolimeru kwasu mlekowego z kwasem glikolowym. Wykazuje on również przejście typu zol-żel pod wpływem temperatury, które jest ściśle zależne od masy cząsteczkowej monomerów budujących termoczułe sieci polimerowe [111,112].

Natomiast termoczułe hydrożele ulegające zmianom objętości pod wpływem temperatury najczęściej zbudowane są z pochodnych akryloamidu takich jak *N*-izopropylakryloamid, *N*-dietyloakryloamid oraz *N*-etyloakryloamid. Hydrożele zbudowane

z tego typu monomerów posiadają zarówno grupy hydrofilowe jak i hydrofobowe, dzięki czemu pod wpływem wzrostu temperatury ulegają przejściu ze stanu spęcniałego w stan skurczony. Temperatuty przejść fazowych żeli zsyntezowanych z tego typu monomerów oscylują nieco poniżej temperatur fizjologicznych. Aby podnieść temperaturę przejścia fazowego należy zwiększyć ilość grup hydrofilowych w polimerze dodając niewielką ilość monomeru o właściwościach jonowych [113,114].

Hydrożele skonstruowane na bazie N-izopropylakryloamidu (NIPA) są materiałami szeroko testowanymi pod kątem uzyskania termoczułych nośników leków. Sieciuje się je *N,N'*-metylenobisakrylamidem a jako inicjator reakcji polimeryzacji występuje odpowiedni nadtlenosiarczan. Przejście fazowe hydrożeli PNIPA możemy zaobserwować bezpośrednio, jako zmniejszenie średnicy hydrożelu i jako zmianę barwy z przezroczystej na mlecznobiałą [115]. Możliwe jest stopniowe uwalnianie substancji z hydrożeli podczas wzrostu temperatury i procesu kurczenia żelu. Dzięki temu można zaprojektować system uwalniania substancji leczniczej w konkretnie ustalonych warunkach temperaturowych, np. system uwalnianie leku przy zastosowaniu miejscowej hipertermii w terapiach przeciwnowotworowych [116].

3.4. Hydrożele czule na pH

Fakt zróżnicowania pH w różnych częściach ciała może być podstawą do tworzenia nośników leków uwalniających substancję czynną pod wpływem środowiskowych zmian kwasowości. Zmiany pH zostały wykorzystane w szczególności przy terapiach przeciwnowotworowych. Związane jest to z obniżeniem pH tkanek w miejscu guza nowotworowego, spowodowanym zwiększoną glikolizą i wzmożonym wytwarzaniem kwasu mlekowego. Różnica pomiędzy pH komórek/tkanek zdrowych i komórek/tkanek nowotworowych stanowi podstawę do projektowania nośników leków, które będą uwalniać lek jedynie w środowisku chorobowo zmienionym [104,117].

Czułość hydrożeli na zmiany pH jest ściśle związana z obecnością dysocjujących kwasowych i zasadowych grup w łańcuchu sieci polimerowej. Mogą być to grupy kwasowe takie jak: karboksylowa czy sulfonowa, jak i również zasadowe takie jak: aminowa czy pirydynowa. W wyniku zmian pH obecne w sieci grupy ulegają dysocjacji lub neutralizacji, co powoduje pęcznienie bądź kurczenie się żelu.

W przypadku hydrożeli posiadających grupy karboksylowe wzrost pH prowadzi do jonizacji tych grup i w konsekwencji do wzrostu ładunku ujemnego na łańcuchach. Powoduje to elektrostatyczne odpychanie łańcuchów polimerowych, i w konsekwencji pęcznienie układu. Natomiast w przypadku żeli posiadających grupy o charakterze zasadowym, wzrost ładunku

dodatniego generowany jest poprzez obniżenie wartości pH i prowadzi w konsekwencji również do pęcznienia hydrożelu [118,119].

Możliwe jest występowanie w strukturze hydrożeli jednocześnie grup kwasowych i zasadowych. Zarówno w niskim jak i wysokim pH następuje wtedy dysocjacja jednej z grup i to powoduje odpychanie między jednoimiennymi ładunkami i w konsekwencji pęcznienie hydrożelu. Natomiast w pH w okolicach punktu izoelektrycznego ilość ładunków dodatnich jak i ujemnych jest podobna; prowadzi to do ich wzajemnego przyciągania i w konsekwencji do kurczenia się hydrożelu [120].

Na stopień pęcznienia hydrożeli zawierających grupy jonowe ma wpływ szereg różnego typu warunków związanych ściśle z rodzajem polimeru. Są to między innymi: stężenie, pK_a grup zjonizowanych, stopień jonizacji, gęstość usieciowania, siła jonowa roztworu i obecność przeciwjonów. Dodatkowo ważnym czynnikiem wpływającym bezpośrednio na kinetykę pęcznienia ma rodzaj zastosowanego buforu. Zostało udowodnione, że stopień pęcznienia hydrożeli w buforach z wielowartościowymi anionami (n.p. a cytrynianami i fosforanami) jest mniejszy niż w buforach z anionami jednowartościowymi [121].

Zależności kwasowo – zasadowe sieci polimerowych mogą być wykorzystane do uwalniania leków zarówno w kwaśnym jak i zasadowym środowisku. Hydrożele posiadające grupy karboksylowe mogą być użyte do dostarczania leków w obrębie jelit gdzie panuje lekko zasadowe środowisko. Z kolei w przypadku hydrożeli zawierających fragmenty zasadowe uwolnienie leku następuje w obrębie środowiska kwasowego; przykładowo nośniki na bazie chitozanu lub poli(etylenoiminy) znalazły zastosowanie do dostarczania leków w okolice żołądka, gdzie występuje znacznie obniżone pH [104,122,123]. Rysunek 9 przedstawia schemat uwalniania leku w zależności od pH dla hydrożeli z grupami zasadowymi i kwasowymi.

leków. Nowatorska generacja nośników leków rozpoznających konkretne cząsteczki w organizmie i uwalniające lek w odpowiedzi na ich obecność daje nowe możliwości kontroli uwalniania substancji na zasadzie sprzężenia zwrotnego i upodabnia się do naturalnych mechanizmów sekrecji w organizmie ludzkim.

3.5.1. Hydrożele czule na glukozę

Hydrożele czule na glukozę są bardzo przydatne w konstrukcji samoregulujących się układów dostarczania insuliny. Dzięki tego typu systemom możliwe jest utworzenie tzw. „sztucznej trzustki”, która uwalnia insulinę w odpowiedzi na stężenie glukozy we krwi.

Aby uzyskać tego typu nośniki leków stosowano podejście polegające na modyfikacji wrażliwych na pH hydrożeli enzymem oksydazą glukozową. Enzym ten jest zdolny do przekształcania glukozy w kwas glukonowy. A więc pojawienie się glukozy powodowało obniżenie pH w okolicy środowiska reakcji i w konsekwencji następowało uwolnienie insuliny z hydrożelu czułego na pH. Tego typu podejście z zastosowaniem różnego typu polimerowych matryc stosowane było przez szereg badaczy [126,127,128]. Wykorzystywali oni między innymi hydrożele zsyntezowane na bazie *N,N*-dietyloaminoetylometaakrylanu (DEA) i metaakrylanu 2-hydroksypropylu (HPMA) usieciowane membraną poliakryloamidową, w której unieruchomiono oksydazę glukozową. W tym systemie glukoza dyfundowała do membrany, przy udziale oksydazy glukozowej następowała konwersja do kwasu glukonowego i obniżało się pH. Niskie pH membrany wywoływało jonizację (sprotonowanie) grup aminowych obecnych w hydrożelu co prowadziło do pęcznienia hydrożelu. W konsekwencji zwiększała się przepuszczalność insuliny przez membranę [129].

Innego typu podejście do konstrukcji systemów dostarczania insuliny czułych na glukozę to wykorzystanie lektyn. Lektyny to białka wiążące węglowodany i oddziałujące z glikoproteinami i glikolipidami na powierzchni komórek wywołując ich adhezję i aglutynację. Badacze wykorzystali specyficzne właściwości lektyn polegające na wiązaniu glukozy. W szczególności przyjrano się konkanawalinie A (Con A) posiadającej cztery miejsca wiążące glukozę [130,131,132]. Do immobilizacji tej lektyny (Con A) wykorzystywano różnego typu polimery, między innymi poli(2-glukozyloetylometaakrylan (PGEMA)). Przygotowano wrażliwe na glukozę hydrożele sieciowane za pomocą Con A. Po umieszczeniu ich w wodnym roztworze glukozy następowało pęcznienie hydrożelu, które było zależne od stężenia cukru. Po prostu gęstość usieciowania hydrożeli PGEMA zmniejszała się wraz ze wzrostem stężenia glukozy, co powodowało rozluźnienie sieci i uwolnienie zakumulowanej wewnątrz insuliny [133].

Do konstrukcji hydrożeli czułych na glukozę wykorzystano również substancje nieorganiczne takie jak kwas fenyloboronowy [134,135]. Kwas ten jak i jego pochodne tworzą kompleksy w roztworach wodnych ze związkami poliolowymi takimi jak glukoza. Właściwości te zostały wykorzystane do utworzenia nośników na bazie termoczułego polimeru PNIPA zmodyfikowanego grupami kwasu fenyloboronowego. Hydrożele te ulegały objętościowemu przejściu fazowemu w odpowiedzi na zewnętrzne stężenie glukozy. Uwolnienie insuliny następowało po przekroczeniu pewnej krytycznej dawki glukozy obecnej w roztworze [136].

3.5.2. Hydrożele czule na enzymy

Hydrożele zbudowane z biodegradowalnych polimerów wrażliwych na obecność specyficznych enzymów mają również duży potencjał rozwojowy w dziedzinie dostarczania leków. Rozkład sieci polimerowej pod wpływem enzymów biorących udział w procesach zachodzących w organizmie ludzkim daje podstawę do tworzenia biodegradowalnych nośników, gdzie substancja lecznicza jest uwalniana w konkretnym miejscu reakcji enzymatycznej [137].

Enzymy obecne w okrężnicy mogą być stosowane, jako cząsteczki sygnałowe do specyficznego podawania leków w obrębie jelita grubego. Obecne w okrężnicy enzymy takie jak dekstranaza są zdolne do rozkładu polisacharydu - dekstranu. Właśnie te właściwości pozwoliły na opracowanie nośnika leku w postaci hydrożelu na bazie dekstranu usieciowanego za pomocą diizocyjanianu do dostarczania substancji leczniczych w nowotworze okrężnicy. Tego typu układy degradowano *in vitro* pod wpływem dekstranazy jak i również testowano *in vivo* na myszach. Określono, że uwalnianie leku bez obecności dekstranazy zachodziło na drodze dyfuzji natomiast w obecności enzymu następował wzrost uwalniania leku spowodowany degradacją hydrożelu. Tego typu systemy hydrożelowe wykazały obiecujące właściwości do dostarczania leków w nowotworach jelita grubego, bezpośrednio do miejsca docelowego [138].

Dekstranaza znalazła też zastosowanie w konstrukcji degradowalnych hydrożeli wrażliwych jednocześnie na dwa rodzaje enzymów [139]. Hydrożele te składały się z samoprzenikających się sieci (IPN) zbudowanych z poli(glikolu etylenowego) i dekstranu zakończonych oligopeptydem. Drugim enzymem niezbędnym do degradacji sieci hydrożelu była papaina. Degradacja enzymatyczna zachodziła jedynie podczas jednoczesnej obecności dwóch enzymów. W obecności jednego z nich sieć polimerowa nie ulegała zmianom. Tego typu podwójna stymulacja za pomocą enzymów pozwoliła na bezpieczne uwalnianie leku do tkanek nowotworowych, gdzie stężenie obydwu enzymów było na wysokim poziomie [140].

Kolejnym podejściem obejmującym wykorzystanie enzymów do dostarczania leków w obrębie jelita grubego jest wykorzystanie produkowanych przez jego mikroflorę azoreduktaz. W celu skonstruowania systemów dostarczania leków specyficznych dla jelita grubego użyto wiązań azoaromatycznych, które mogą być degradowane przez azoreduktazę. Wiązania te wykorzystano w sieciowaniu hydrożeli wrażliwych na pH. Hydrożele syntezowano z *N,N'*-dimetyloakryloamidu (DMAAm), tertbutyloakryloamidu (BAAm) oraz kwasu akrylowego (AAc), który dzięki obecności grup karboksylowych wnosił wrażliwość hydrożelu na pH. Ze względu na niewielki stopień pęcznienia w kwaśnym środowisku, tego typu hydrożele chronią leki białkowe przed trawieniem przez enzymy protolityczne w żołądku. W dalszych częściach układu pokarmowego pH jest wyższe i żele pęcznią ze względu na jonizację grup karboksylowych zawartych w sieci hydrożelu. Po dotarciu do okrężnicy, dzięki obecności azoreduktazy, możliwa jest degradacja sieci hydrożelu i uwolnienie leku. Badania nad tego typu nośnikami wykazują, że połączenie degradacji enzymatycznej z wrażliwością na pH hydrożeli umożliwia dostarczenie leków do miejsc docelowych i uwalnianie ich poprzez degradację środowiskową [141,142].

3.5.3. Hydrożele czule na glutation

Glutation jest bardzo ważną cząsteczką występującą w organizmie i biorącą udział w utrzymaniu równowagi redox. Ma właściwości przeciwutleniające i działa w ustroju, jako układ oksydo-redukcyjny chroniący grupy –SH białek przed utlenieniem. W tkankach organizmu glutation występuje w kilku formach takich jak: glutation zredukowany (GSH), glutation utleniony (GSSG), S-nitrozoglutation (GSNO) oraz różnego typu disiarczki mieszane glutationu i białek. Zredukowany glutation pełni rolę detoksykacyjną, neutralizuje wolne rodniki oraz bierze udział w odpowiedzi immunologicznej organizmu na pojawienie się różnego typu patogenów. Udowodniono, że przy odpowiednio wysokim poziomie glutationu komórki nie ulegają procesowi apoptozy, czyli zaprogramowanej śmierci komórkowej. Ze względu na duże stężenie GSH w przestrzeni wokół guza nowotworowego utrudnione jest niszczenie przez niektóre leki komórek nowotworowych. Dlatego też w tych przypadkach zmniejszenie stężenia glutationu w komórkach nowotworowych mogłoby się przyczynić do zwiększenia skuteczności terapii przeciwnowotworowych [143].

Z drugiej strony, w ostatnich latach powstało szereg prac wykorzystujących występowanie glutationu w organizmie do kontrolowanego uwalniania substancji leczniczych. Strategia działania tego typu systemów czułych na glutation związana jest ze zwiększoną aktywnością wydzielania GSH w okolicach komórek nowotworowych. Dzięki odpowiedniej konstrukcji

nośniki mogą uwalniać lek w odpowiedzi na zwiększone stężenie glutationu we krwi w okolicach guza nowotworowego [144,145]. Szczególne możliwości pojawiają się po wprowadzeniu wiązań disiarczkowych –SS– do łańcuchów polimerowych nośników.

Jedną z pierwszych prac opisujących polimerowe nośniki leków wrażliwe na GSH opublikował Kakizawa wraz ze swoim zespołem. Zsyntezowali oni polimerowe micelle z oligonukleotydami antysensownymi szczepionymi ze sobą za pomocą oddziaływań elektrostatycznych. Rdzeń cząstek stanowił tiolowany poliglikol etylenowy zawierający blok poli L-lizyny i mostki disiarczkowe zdolne do degradacji wewnątrz komórek, a pozostające nieaktywne w krwioobiegu. Badania wykazały, że zsyntezowane micelle miały wysoką stabilność koloidalną i zdolność od uwalniania zakumulowanych oligonukleotydów w obecności glutationu na poziomie wewnątrzkomórkowym [146]. Z kolei Caruso i wsp. opracowali syntezę nanoporowatych sfer polimerowych podatnych na redukcję GSH. Zakumulowanym lekiem przeciwnowotworowym była doksorubicyna (Dox). Matrycę zmodyfikowano poliglikolem etylenowym i następnie przyłączono Dox za pomocą wiązań kowalencyjnych zawierających degradowalne mostki disiarczkowe. Wykazano, że tego typu cząstki były nietoksyczne i uwalniały lek w warunkach podwyższonego stężenia GSH [147].

Innym przykładem wykorzystania wiązań disiarczkowych była synteza biokompatybilnych i degradowalnych nanożeli wykonana przez grupę badawczą Groll. Zsyntezowali oni nanożele o średnicy ok 380 nm poprzez sieciowanie tiolowanego politlenku etylenu i tlenku propylenu metodą odwróconej mikroemulsji. Wykazano, że nanożele te ulegały degradacji po 6 h inkubacji w 10 mM roztworze glutationu [148].

Jednym z najnowszych trendów jest połączenie żelu czułego na pH z żelem redox czułym na glutation. Zsyntezowane zostały nanożele na bazie metaakrylowanego dekstranu (DEXMA) 2-aminometylmetaakrylanu (AEMA) i N'-bis akrylocysteaminy. Nanożele wykazywały jednorodny rozkład wielkości oraz kształt. Zostały napełnione lekiem metotreksatem (MTX). Lek uwalniano w różnych warunkach pH jak i również w obecności GSH. Wykazano, że uwalnianie leku było 5-krotnie wyższe w obniżonym pH w obecności glutationu niż w warunkach pH obojętnego. Wykazano również znaczący wpływ na internalizację komórek nowotworowych Hella w wyżej wymienionych warunkach eksperymentalnych [149].

3.6. Hydrożele modyfikowane DNA

DNA ze względu na swoje unikalne właściwości zostało uznane za jeden z wiodących naturalnych polimerów stosowanych szeroko w badaniach biomedycznych. Względna prostota jego struktury, stabilność w warunkach fizjologicznych, biokompatybilność, a także

elastyczność i odwracalność zmian strukturalnych zachęciły naukowców do tworzenia nowego typu hydrożeli modyfikowanych tym materiałem genetycznym.

Dotychczas opisano dwie strategie projektowania hydrożeli zawierających DNA jako składową sieci hydrożelu. Jedną z nich jest syntezywanie rozgałęzionych struktur na bazie samego DNA [150]. Drugie podejście polega na przyłączaniu kwasów nukleinowych do hydrofilowych łańcuchów polimerowych oraz użycie DNA jako środka sieciującego hydrożele polimerowe [151].

Synteza hydrożeli składających się z samego DNA zachodzi w oparciu o oddziaływania fizyczne, a nie wiązania chemiczne. Hydrożele DNA wytwarzane są jedynie z syntetycznych odcinków DNA. Tworzenie hydrożeli z DNA natywnego było opisywane, jednak wiązało to się z niską stabilnością hydrożeli i brakiem kontroli nad procesem tworzenia hydrożelu. Wykazano, że pęcznienie oraz właściwości mechaniczne hydrożeli DNA zależą ściśle od stężenia i konformacji form DNA, z którego zostały zbudowane.

Hydrożele supramolekularne składające się wyłącznie z DNA zostały opisane po raz pierwszy przez grupę badawczą Liu [152]. Wykorzystali oni trzy częściowo komplementarne sekwencje tworzące w lekko zasadowym pH strukturę w kształcie litery Y. Składała się ona z dwuniciowej domeny centralnej i trzech ramion pobocznych, jako sekwencji blokujących. W obniżonym pH struktura ta ulegała samoorganizacji z utworzeniem trójwymiarowej sieci hydrożelu. Badano odwracalność tworzenia się tego typu struktur w różnych warunkach pH. Niestety hydrożele DNA nie wykazywały zdolności do pęcznienia jak i możliwości skutecznej akumulacji małych cząstek. Związane było to ze sztywnością dwuniciowych struktur DNA i brakiem ich elastyczności. Okazało się, że materiały te nie były zdolne do akumulacji i uwalniania leków.

Inną strategię syntezy obrała grupa Lee, która do wytworzenia hydrożelu DNA zastosowała enzym polimerazę DNA. Najpierw prowadzono namnażanie się DNA w postaci toczącego się koła, a następnie odchodzącego od niego łańcucha bocznego ulegającego zawinięciu z utworzeniem struktury 3D. Otrzymany meta-hydrożel wykazywał właściwości podobne do ciał stałych w obecności wody, natomiast po usunięciu wody przypominał ciecz. Autorzy zasugerowali możliwość użycia tego typu hydrożeli do terapii komórkowej i uwalniania leków [153].

Powstało wiele prac opisujących rozgałęzione lub koliste formy DNA do wytworzenia hydrożeli DNA [154,155,156]. Jednak nowsze podejście zakłada tworzenie hydrożeli za pomocą liniowego dsDNA wyposażonego w lepkie końce. Wytworzono hydrożele DNA wykonując hybrydyzację dwóch oligomerów O1 i O2 konstruując monomeryczny blok

budulcowy dsDNA składający się z 30 par zasad. Wyposażenie tego bloku w komplementarne do siebie lepkie końce powoduje samoorganizację DNA w struktury hydrożelowe. Struktury liniowe syntezowane za pomocą tej metody mogą mieć bardzo wysoką elastyczność. Jednak posiadają niską stabilność ze względu na niekowalencyjne połączenie fizyczne i obecność nacięć w szkielecie cukrowo-fosforanowym po każdej powtarzającej się jednostce ssDNA [157].

Warto podkreślić, że hydrożele na bazie samego DNA wymagają skomplikowanych warunków syntezy oraz zastosowania biologicznych procedur manipulowania materiałem genetycznym. Koszty wytworzenia tego typu hydrożeli są wysokie, dlatego też głównie uwaga została skupiona na hydrożelach hybrydowych DNA [151,158]. Tego typu hydrożele zbudowane są na bazie polimerów syntetycznych i modyfikowane oligonukleotydami poprzez chemiczne wiązanie ich do sieci polimerowej. Oligonukleotydy mogą niezależnie współistnieć w sieci polimerowej lub być wykorzystane jako środek sieciujący.

Najszerzej opisywanym polimerem wykorzystywanym do syntezy hybrydowych żeli DNA jest poliakryloamid. Grupa Willner'a szeroko opisywała tego typu układy do potencjalnych zastosowań biomedycznych. W jednej z publikacji zsyntezowali łańcuchy poliakryloamidu i zmodyfikowali je kwasami nukleinowymi oraz mostkami cytozynowymi. Ugrupowania cytozyny zdolne były do przyłączania jonów srebra i tworzenia koniugatów, a więc po dodaniu jonów Ag^+ powstawały usieciowane hydrożele. Po usunięciu jonów srebra z sieci hydrożelu za pomocą cysteaminy następowało przejście fazowe do postaci zolu [159].

Ważnym trendem w układach polimerowych modyfikowanych materiałem genetycznym jest wykorzystanie komplementarności zasad do konstrukcji hydrożeli czułych na konkretne sekwencje DNA. Koncepcja konstrukcji tego typu układów polega na przyłączeniu nici sygnałowej/analitu do nici obecnej w sieci hydrożelu i uzyskanie przejścia typu zol- żel. Układ taki połączono dodatkowo z aptamerem wiążącym trombinę i tworzącym w jej obecności układy typu kwadrupleks. Po uwolnieniu nici DNA, rozluźnieniu ulegała struktura wewnętrzna hydrożelu i następowało uwolnienie zawartych w niej substancji. Proces ten był całkowicie odwracalny; po ponownym dodaniu nici DNA następowało sieciowanie i zacieśnienie struktury żelu. Wykonane badania wykazały wysoki potencjał zastosowania tego typu żeli, jako materiału przełącznikowego użytecznego w systemach dostarczania leków [160].

Innym przykładem wykorzystania DNA było jego zastosowanie do sieciowania żelu na bazie poliakryloamidu służącego do selektywnego wiązania adenozyiny. W tym celu odpowiednie sekwencje DNA zmodyfikowane aptamerem mającym powinowactwo do

wychwytywanej substancji przyłączono do cząsteczek adenozy. Kolejno powstałe hybrydy zostały przyłączone do hydrożelu zmodyfikowanego odpowiednimi sekwencjami DNA. W celu ich uwolnienia przyłączona zostaje nić komplementarna do nici łącznika, co powoduje rozluźnienie łańcuchów i w konsekwencji uwolnienie substancji wychwytywanej [161].

Różnice pomiędzy właściwościami pojedynczych oraz podwójnych nici DNA stały się podstawą do konstruowania hydrożeli czułych na DNA. Jak wiadomo ssDNA jest bardziej elastyczny niż dsDNA. Natomiast dsDNA posiada znacznie większą trwałość i odporność mechaniczną. Zmiany konformacyjne związane z przyłączeniem komplementarnej nici mogą indukować objętościowe przejście fazowe hydrożelu. Zsyntezowano hydrożele na bazie poliakryloamidu zawierające pojedyncze odcinki DNA w roli środka sieciującego. Dodanie poszczególnych komplementarnych oligonukleotydów powodowało skurczenie bądź pęcznienie hybrydowego hydrożelu w zależności od ilości dodanej sekwencji [162,163].

4. Nanożele i mikrożele polimerowe

W ostatnich latach nanotechnologia i tworzone na jej drodze nanomateriały cieszą się szerokim zainteresowaniem. Według definicji nanomateriał jest to materiał, którego jeden z wymiarów zewnętrznych nie przekracza nanoskali lub którego struktura mieści się w nanoskali, czyli w przedziale od 1 do 100 nm. Jednak w nanomedycynie często stosuje się przedrostek nano w stosunku do materiałów posiadających rozmiar submikronowy [164].

Nano/mikrożele zostały zdefiniowane na kilka sposobów. Jedna z definicji określa nano- mikrożele, jako układ dwuskładnikowy składający się z trójwymiarowej sieci łańcuchów polimerowych i rozpuszczalnika o wymiarach odpowiednio nano- i mikrometrowych [165]. Inna definicja mówi, że nanożel bądź mikrożel jest wewnętrznie usieciowaną makrocząsteczką. Podejście to opiera się na fakcie, iż wszystkie elementy łańcucha nano/mikro żelu są ze sobą połączone i stanowią część jednej makrocząsteczki „rozproszonyj” w rozpuszczalniku [166,167]. W literaturze cząstki o rozmiarach submikrometrowych są nazywane zamiennie nano lub mikrożele. Związane jest to z występowaniem ich w dwóch różnych formach spęczniałej i skurzonej; pomiar ich rozmiaru może następować w jednej bądź drugiej formie [168]. W dalszej części pracy chciałabym się skupić na cząstkach o mniejszych rozmiarach i posługiwać się będę terminem nanożele.

Nanożele wykazują właściwości podobne do ich odpowiedników w skali makro jednak ze względu na swój mały rozmiar charakteryzują się znacznie szybszą odpowiedzią na bodźce środowiskowe. W rzeczywistości masy cząsteczkowe i wymiary spęczniałych nanożeli są często podobne do typowych pojedynczych makrocząsteczek w roztworze. Jednak obecność

wiązań wewnętrznych powoduje ich odmienne właściwości fizykochemiczne. Chodzi o kształt, wyższą odporność na degradację i zdolność do pułapkowania małych cząsteczek w ich strukturze wewnętrznej. Właściwości nanożeli zależą ściśle od ich stężenia, metody syntezy, gęstości usieciowania jak i również rodzaju monomerów oraz rozpuszczalnika użytych do ich syntezy. Najczęściej badane są nanożele złożone z hydrofilowych polimerów posiadające zdolność do pęcznienia w wodzie. Nazywamy je nanohydrożelami. Posiadają one w swojej strukturze polimerowej grupy hydrofilowe takie jak: karboksylowe, hydroksylowe i aminowe, które decydują bezpośrednio o ich właściwościach [165,169].

Podobnie jak w przypadku żeli makro, największym zainteresowaniem cieszą się nanożele wrażliwe na stymulację przez bodźce zewnętrzne, tzw. „nanożele inteligentne”. Reagują one zmianą rozmiarów w odpowiedzi na zmianę czynników zewnętrznych takich jak: temperatura [170], pH [171], moc jonowa [172], pole elektryczne i magnetyczne [173], światło oraz obecność ściśle określonych cząstek [174]. Tego typu struktury znalazły zastosowanie w biomedycynie, jako nośniki kontrolowanego i samoregulującego się dostarczania leków [175,176]. Ze względu na swój niewielki rozmiar, specyficzną budowę i czułości na warunki środowiskowe mogą być efektywnie transportowane przez naczynia włosowate i uwalniane w miejscu docelowym z odpowiednią szybkością. Ich zalety, w porównaniu do nanonośników różnego typu to:

- możliwość kontroli rozmiaru i powierzchni co zapobiega zniszczeniu nośników przez układ fagocytalny (RES) i umożliwiającą aktywne bądź bierne dostarczenie leku,
- kontrolowane i długotrwałe uwalnianie leku w miejscu docelowym pod wpływem bodźców środowiskowych znacznie poprawiające skuteczność terapeutyczną,
- duża ładowność leku w strukturze wewnętrznej umożliwiającą wysoką wydajność uwalniania i pozwalającą na mniejszą częstotliwość dawkowania leku,
- zdolność do penetracji tkanek i transportu przez szlaki para i trans komórkowe,
- biokompatybilność i często możliwość degradacji.

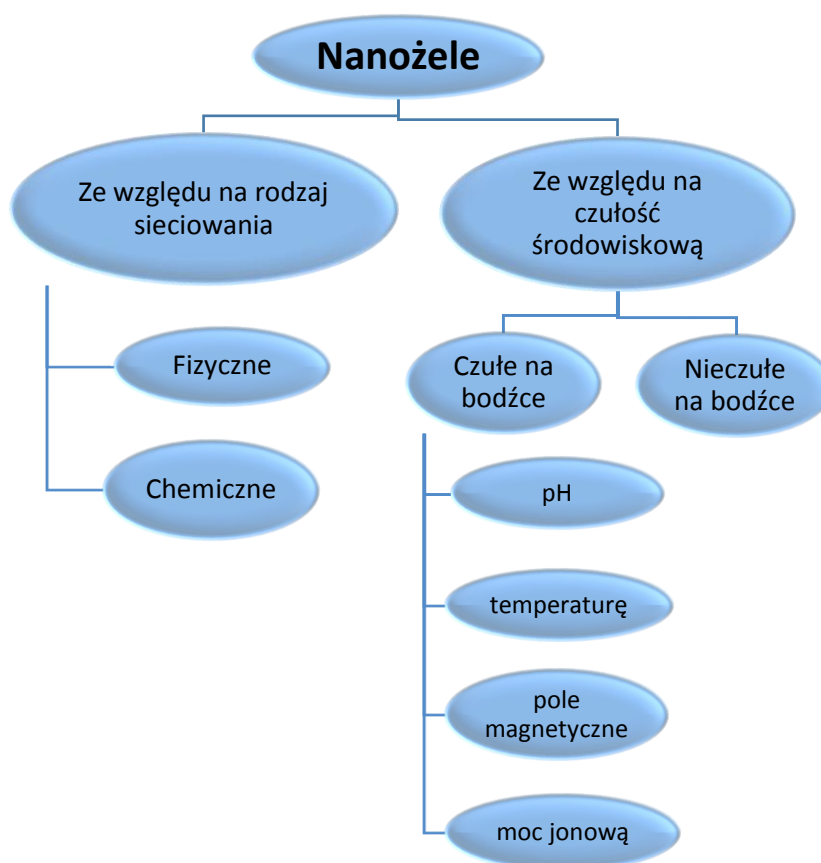
4.1. Charakterystyka i klasyfikacja

Nanożele można podzielić według dwóch różnych kryteriów. Pierwsze kryterium dotyczy rodzaju wiązań i typu sieciowania wewnątrz struktury polimerowej. Według tego kryterium dzielimy nanożele na sieciowane na drodze chemicznej bądź fizycznej. Schemat podziału nanożeli został umieszczony na rysunku 10 [177].

Nanożele usieciowane fizycznie zwane są również pseudożelami. Tworzenie się sieci polimerowej zachodzi poprzez wiązania niekowalencyjne, takie jak: *van der Waals'a*,

wodorowe, hydrofobowe i elektrostatyczne. Ich właściwości zależą ściśle od charakterystyki monomeru stosowanego do ich produkcji, temperatury, stężenia, rodzaju środka sieciującego i siły jonowej rozpuszczalnika. Sieciowanie nanożeli na drodze fizycznej zachodzi według prostych metod. Sposoby te obejmują między innymi procesy takie jak: połączenie bloków amfifilowych, agregacja i samoorganizacja łańcuchów polimerowych jak i również kompleksowanie przeciwnie naładowanych łańcuchów polimerowych. Nanożele fizyczne charakteryzują się zazwyczaj biodegradowalnością związaną z odwracalnym sposobem przechodzenia z zolu w żel. Przykładami nanożeli usieciowanych fizycznie są nanożele modyfikowane liposomem. Składają się one z liposomów, do których włączone zostały łańcuchy N-izopropylakryloamidu za pomocą oddziaływań elektrostatycznych. Połączenie tych dwóch indywidualów powoduje, iż tego typu hybrydowe nanożele są wrażliwe zarówno na pH jak i temperaturę [178]. Innym przykładem sieciowania fizycznego są nanocząstki micelarne składające się z hydrofilowych i hydrofobowych bloków polimerowych. oddziałujących ze sobą. Celem tego typu modyfikacji jest fizyczne pułapkowanie leków i makrocząstek biologicznych wewnątrz granic powłoki i dostarczenie ich do miejsca docelowego. Częstki tego typu chronią lek przed hydrolizą lub degradacją enzymatyczną [179]. Kolejnym typem nanożeli fizycznych są tzw. nanożele hybrydowe składające się z różnego typu biopolimerów połączonych ze sobą za pomocą oddziaływań hydrofobowych i elektrostatycznych. Przykładami są między innymi nanożele na bazie pullulanu, dekstranu, chitosanu oraz alginianu [180,181].

Nanożele chemiczne ze względu na wykorzystanie trwałych wiązań kowalencyjnych są bardziej stabilne niż nanożele fizyczne. Siła ich wiązania jest w dużym stopniu zależna od charakteru grup funkcyjnych obecnych w łańcuchach polimerowych nanożeli. Różnorodność wyboru polimerów jak i również środków sieciujących do chemicznego sieciowania nanożeli stwarza nieograniczone możliwości syntezy nanocząstek o różnych właściwościach i zastosowaniach. Możliwe jest włączanie do sieci polimerowej mniej trwałych ugrupowań, np. mostków disiarczkowych i selenkowych, które degradują pod wpływem warunków środowiskowych i w ten sposób umożliwiają zniszczenie polimerowej struktury i jednocześnie uwolnienie leku w niej zawartego. Kowalencyjne nanożele składające się z polimerów zarówno hydrofilowych jak i amfifilowych otrzymywane są zazwyczaj w wyniku polimeryzacji monomerów winylowych [182,183].



Rys. 10. *Klasyfikacja nanożeli polimerowych.*

4.2. Synteza

Ze względu na różnorodność zastosowań nanożeli w biomedycynie prowadzi się szerokie badania nad nowymi metodami syntezy. Ważnym aspektem jest możliwość bezpośredniej kontroli rozmiaru, wielkości i kształtu oraz wydajności syntezowanych nanożeli poprzez dobranie odpowiednich warunków i procedury syntezy. Synteza nanożeli może zachodzić na kilka różnych sposobów i każda z tych metod ma zarówno swoje zalety jak i wady. Sposoby te obejmują zasadniczo trzy główne techniki syntezy, takie jak: 1) jednoczesna polimeryzacja i sieciowanie, 2) sieciowanie wewnątrzcząsteczkowe makrocząsteczek 3) konwersja makrożeli do nanożeli. W pierwszym sposobie polimeryzacji otrzymujemy strukturę trójwymiarową nanożelu. Wolne rodniki powstałe w procesie inicjacji polimeryzacji reagują zarówno z cząsteczkami monomerów jak i środka sieciującego tworząc strukturę rozgałęzioną i bogatą w miejsca sieciowania. Do wytwarzania nanożeli stosuje się m.in. następujące typy polimeryzacji: a) emulsyjna, b) w roztworze, c) w objętości d) w zawiesinie. W kolejnych podrozdziałach zostaną przedstawione te metody syntezy, które są najczęściej stosowane do tworzenia nośników leków.

4.2.1. Polimeryzacja w roztworze

Większość prac nad syntezą mikro i nanożeli poprzez sieciowanie w roztworze przeprowadzana jest z wykorzystaniem mechanizmu wolnorodnikowego. Technika ta nie jest idealna, gdyż prowadzi do powstawania cząstek o dość dużym rozkładzie rozmiaru. Jej zaletą jest fakt, że nie wymaga środków powierzchniowo czynnych stabilizujących układ. Tworzenie nanożeli tą metodą wymaga bardzo starannego doboru parametrów reakcji. Szczególnie trudne jest sterowanie propagacją liniowych łańcuchów polimerowych oraz balansem sieciowania wewnątrzcząsteczkowego i międzycząsteczkowego, aby uniknąć tworzenia makrostruktur. Aby uzyskać mikro/nanożele trzeba kontrolować stężenia monomerów w mieszaninie. Reakcje polimeryzacji prowadzi się w roztworach rozcieńczonych, w których oddziela się rosnące łańcuchy polimerowe. W przypadku rozcieńczonych roztworów monomerów promowana jest reakcja wewnątrzcząsteczkowego sieciowania nanożeli w stosunku do reakcji tworzenia makrostruktur. Przeciwnie jest w roztworach stężonych, gdzie udział sieciowania międzycząsteczkowego znacznie wzrasta i powoduje powstawanie makrożeli [166, 181].

W praktyce w celu uniknięcia tworzenia agregatów należy stosować rozcieńczone roztwory monomerów ($C < 5\%$) i zatrzymać syntezę zanim powstałe mikro/nanocząstki zaczęły reagować ze sobą. Ważny jest również odpowiedni dobór rozpuszczalnika. Pokazano na przykład, że w kopolimeryzacji krzyżowej diwinylobenzenu i bezwodnika maleinowego w różnych rodzajach rozpuszczalników powstają produkty o różnych morfologiach w zależności od składu rozpuszczalnika.

Szereg grup badawczych opisał syntezę polimeryzacji wolnorodnikowej nanożeli na bazie N-zopropylakryloamidu sieciowanego *N,N*-dimetylobisakryloamidem w obecności nadtlenu siarczanu amonu, jako inicjatora reakcji w temperaturze pokojowej. Podczas syntezy monitorowano przebieg postępów reakcji w czasie rzeczywistym oraz badano towarzyszące temu efekty termiczne [184, 185, 186].

Szczególnym przypadkiem polimeryzacji sieciującej w roztworze jest polimeryzacja strąceniowa. Użycie tej formy syntezy powodowało, że nanocząstki formowane w roztworze miały skłonność do kurczenia się i strącania. W rezultacie uzyskane nanożele wykazywały wysoki stopień monodispersyjności. Polimeryzacja strąceniowa okazała się szczególnie przydatna do wytwarzania termoczułych nanożeli; istniała możliwość zmiany szybkości strącania cząstek poprzez kontrolę temperatury reakcji. W praktyce stosuje się podwyższoną temperaturę, wyższą od LCST; następuje wytrącenie się cząstek z roztworu, a następnie obniżenie temperatury powoduje rozpuszczenie produktu. Za pomocą tej metody zsyntezowano szereg nanożeli na bazie N-winylokaprolaktamu i jego kopolimerów z akrylanem sodu.

Monomerami były również N-izopropylakryloamid i kwasy metaakrylowe [187,188,189]. Należy zauważyć, że użycie terminu polimeryzacji strąceniowej nie jest ograniczone do polimeryzacji w roztworze. Ten typ polimeryzacji może występować również w polimeryzacji emulsyjnej bez użycia środków powierzchniowo czynnych.

4.2.2. Polimeryzacja emulsyjna

W przeciwieństwie do polimeryzacji nano/mikrożeli w roztworze, polimeryzacja emulsyjna rozwiązuje problem powstawania niechcianych makrożeli. Umożliwia uzyskanie cząstek o bardzo wąskim rozkładzie rozmiaru. Polimeryzację emulsyjną zazwyczaj prowadzi się w obecności środków powierzchniowo czynnych, jednak opracowano również metodę, która pozwala przeprowadzić syntezę bez ich obecności. Wyróżniamy trzy rodzaje polimeryzacji emulsyjnej: polimeryzację mikro-emulsyjną, inwersyjną polimeryzację mikro-emulsyjną oraz polimeryzację emulsyjną bez użycia surfaktantu, tzw. polimeryzację strąceniową (SFPP) [190].

W polimeryzacji mikroemulsyjnej monomery zostają rozpuszczone w fazie ciekłej (zazwyczaj w wodzie) w obecności surfaktantu i tworzą tzw. micelle. W przeciwieństwie do klasycznej polimeryzacji emulsyjnej, w polimeryzacji mikroemulsyjnej po osiągnięciu krytycznego stężenia emulgatora całkowita ilość monomeru zostaje zamknięta w micelach, co prowadzi do uzyskania idealnie monodispersyjnych cząstek nanożeli [191]. Po dodaniu odpowiedniego inicjatora w fazie ciekłej powstają wolne rodniki i następuje wzrost łańcucha polimerowego. Ze względu na obecność surfaktanta, rosnący łańcuch polimerowy ma tendencję do rozdzielania się na poszczególne cząstki, w których zachodzą kolejne etapy polimeryzacji i sieciowania [192].

W swojej pracy badawczej do syntezy termoczułych nanożeli używałam między innymi polimeryzacji mikroemulsyjnej. Tworzenie nanożeli PNIPA metodą polimeryzacji mikroemulsyjnej polega na rozpuszczeniu monomerów w wodzie z dodatkiem surfaktanta dodecylosiarczanu sodu (SDS), a następnie ogrzaniu mieszaniny do temperatury powyżej LCST (50-60 °C) przy jednoczesnym odtlenianiu roztworu gazem obojętnym. Kolejnym etapem jest dodanie inicjatora reakcji APS, który powoduje powstawanie łańcuchów polimerowych wewnątrz miceli utworzonych przez surfaktant. Ze względu na to, że polimer PNIPA wykazuje właściwości termoczułe, podwyższona temperatura przeciwdziała nieograniczonemu wzrostowi łańcucha polimerowego. Łańcuchy polimerowe po osiągnięciu krytycznej długości zwijają się wewnątrz miceli tworząc cząsteczki nanożelu. Rozmiar syntezowanych tą metodą nanożeli jest ściśle związany z ilością użytego surfaktantu. Wysokie

stężenie środków powierzchniowo - czynnych powoduje powstawanie cząsteczek o małym rozmiarze (skala nano) natomiast niskie stężenie prowadzi do powstawania żeli w skali mikro.

Większość syntez polimeryzacji emulsyjnej jest wykonywana w układach gdzie fazą ciekłą jest faza wodna a monomery i polimery mają charakter względnie hydrofobowy. Jednak, gdy odwrócimy sytuację i przeprowadzimy polimeryzację hydrofilowych monomerów w organicznej hydrofobowej fazie ciekłej, otrzymamy nanożele metoda inwersyjnej polimeryzacji emulsyjnej. Mechanizm i kinetyka tworzenia się nanożeli w takiej odwróconej polimeryzacji emulsyjnej zostały zbadane na przykładzie akryloamidu [193]. Opisano wpływ rodzaju rozpuszczalnika, rodzaju i stężenia emulgatora, zawartości monomeru oraz wpływu szybkości mieszania na właściwości powstałego produktu. Technika ta pomocna jest również w syntezie nanożeli polielektrolitowych o jednorodnym rozmiarze. Przykładowo, tą metodą zsyntezowano nano/mikro cząstki żelowe na bazie kwasu akrylowego kopolimeryzowane z diakrylanem glikolu dietylenowego. Produkty tej syntezy miały różne średnice w zależności od stężenia środków powierzchniowo czynnych, natomiast polidispersyjność była mniejsza niż 10% [194].

Wadą metod polimeryzacji z zastosowaniem środków powierzchniowo czynnych jest stosunkowo trudne wypłukiwanie tych związków z roztworu nanożeli. Ich kompletne wymycie jest bardzo ważne przy produkcji nośników leków ze względu na ich cytotoksyczność ustrojową. Rozwiązaniem tego problemu jest metoda polimeryzacji mikroemulsyjnej bez użycia surfaktantu (ang. *Surfactant-Free Emulsion Polymerization*, SFEP), gdzie stabilizacja emulsji jest zapewniana przez sam monomer i/lub polimer. Tego typu syntezę można zrealizować, na co najmniej dwa sposoby. W pierwszym z nich inicjatorem reakcji polimeryzacji wolnorodnikowej jest jon, który po wbudowaniu w rosnący łańcuch polimerowy powoduje, że staje się on aktywny powierzchniowo. Natomiast w drugim przypadku substraty polimeryzacji występują w postaci oligomerów posiadających zjonizowane grupy na jednym lub dwóch końcach i stabilizują elektrostatycznie narastające łańcuchy polimerowe nanożeli. Synteza jest zwykle prowadzana w obecności soli nadsiarczanowej jako inicjatora rozkładającego się na rodniki SO_4^* zdolne do przyłączania się do cząsteczek monomeru i inicjowania wzrostu łańcucha. Rosnące oligomeryczne rodniki przenoszą anionową grupę siarczanową do końca łańcucha i zachowują się podobnie jak środek powierzchniowo czynny.

Metoda ta została z powodzeniem zastosowana do syntezy nanożeli na bazie *N*-izopropylakryloamidu [195, 196], metaakrylanu metylu [197], styrenu [198] i kwasu metakrylowego [199]. Syntezę nanożeli PNIPA prowadzi się powyżej temperatury LCST, powodując powstawanie zarówno łańcuchów rosnących jak i sieciujących. W przypadku tego

typu nanożeli obniżenie temperatury powoduje przejście ze stanu ubogiego w rozpuszczalnik do stanu spęcniałego. Synteza nanożeli PNIPA za pomocą tej metody pozwala na otrzymanie monodispersyjnych cząstek koloidalnych nano/mikro żelu. Jednak rozmiar cząstek zazwyczaj jest większy niż przy zastosowaniu metod stabilizowanych surfaktantem [200]. Możliwe jest również syntezowanie nanożeli kopolimerowych opartych na polimerze PNIPA poprzez wprowadzenie rozpuszczalnych w wodzie monomerów winylowych takich jak akryloamid, kwas akrylowy czy chlorowodorek N-akryloglicyny [201,202].

4.3. Modyfikacja nanożeli materiałem biologicznym

Aby poszerzyć właściwości nanożeli często można zastosować różnego typu modyfikacje. Szczególnie popularne jest łączenie nanomateriałów z cząstkami biologicznie czynnymi, które poprawiają ich biodostępność i zmniejszają cytotoksyczność ustrojową. Projektuje się nośniki skoniugowane z różnego typu ligandami powinowactwa, przeciwciałami, aptamerami lub innymi cząsteczkami o swoistości rozpoznawania molekularnego. Dzięki temu możliwe jest skierowanie nośnika leku w miejsce konkretnych tkanek wytwarzających markery chorobowe i tam uwolnienie substancji czynnej [203].

Biokoniugaty nanożeli to systemy o złożonej i zorganizowanej strukturze, których projektowanie wymaga wielu działań na poziomie molekularnym. Muszą spełniać szereg wymagań takich jak: jednolita wielkość i skład, biogodność a przede wszystkim możliwość kontroli zmian ich właściwości w warunkach fizjologicznych. Przygotowanie tego typu systemów wymaga użycia ostatnich osiągnięć chemii polimerów w tym szerokiego wachlarza syntez i metod polimeryzacji oraz chemii koniugacji i aktywacji. Modyfikacje materiałem biologicznym mogą zachodzić na drodze trzech mechanizmów:

- modyfikacji typu fizycznego – przy wykorzystaniu oddziaływań niekwalencyjnych takich jak: oddziaływania hydrofobowe, wiązania wodorowe, oddziaływania elektrostatyczne oraz absorpcja na powierzchni struktury nanożelu,
- modyfikacji typu chemicznego (strukturalnych) - przy wykorzystaniu wiązań kowalencyjnych pomiędzy modyfikatorem, a siecią polimerową nanożelu,
- samoorganizacji materiału biologicznego na powierzchni nanożelu.

Modyfikacje z wytworzeniem wiązań kowalencyjnych można prowadzić bezpośrednio podczas syntezy nanożelu jak i również po syntezie i odczyszczeniu gotowych nanożeli. Aby wprowadzić substancje biologiczne do sieci nanohydrożelu wykorzystuje się różnego typu grupy funkcyjne. Są to między innymi: grupy akrylowe, karboksylowe czy aminowe. Często

stosowaną metodą biokonjugacji nanożeli na bazie N-izopropylakryloamidu i jego kopolimerów jest kowalencyjne włączenie cząstek biologicznych (enzymów, białek, oligonukleotydów) wcześniej zmodyfikowanych grupami akrylowymi [204,205].

Innego typu modyfikacje nanożeli polegają na kowalencyjnym wprowadzaniu leków do ich sieci. Zsyntezowano między innymi usieciowane nanożele na bazie glikolu etylenowego i kwasu metakrylowego z kowalencyjnie włączonym lekiem przeciwnowotworowym cis - platyną. Lek był włączony do sieci za pomocą grup karboksylowych. Badania nad tego typu nośnikami leków wykazały dużą skuteczność przeciwnowotworową wyrażaną poprzez cytotoksyczność na modelu mysim. Nanożele te charakteryzowały się przedłużonym czasem krążenia we krwi oraz zwiększoną akumulacją w okolicy miejsc nowotworowo zmienionych [206].

W literaturze opisano również kowalencyjne włączanie białek do nanożeli. Grupa badawcza Matsumoto opracowała usieciowane nanożele na bazie metaakrylanu eteru glikolu etylenowego w koniugacie z albuminą surowicy bydlęcej (BSA). Tego typu nanosystem może być wykorzystywany jako skuteczna platforma do dostarczania leków o charakterze lipofilowym. Cząsteczki lipofilowych leków mogą być wiązane zarówno wewnątrz i jak i na zewnątrz białek włączonych do sieci nanohydrożelu. Tego typu układ zapewnia ochronę dla substancji czynnej jak i również dostarczenie i efektywne uwolnienie w miejscu docelowym [207].

Często do akumulacji leków bądź innych substancji czynnych stosowane są wiązania niekowalencyjne, które są ściśle związane ze strukturą i właściwościami danego typu nanożelu. Do fizycznej akumulacji leków wewnątrz nanożeli stosowany jest szereg technik takich jak: dializa, nanoprecypitacja, odparowanie rozpuszczalnika czy wymiana rozpuszczalnika. Wydajność kapsułkowania leku jest różna dla każdego nanosystemu i zależy od rodzaju oddziaływań pomiędzy polimerową matrycą i wprowadzoną substancją aktywną. Ważne jest odpowiednie dobranie nośnika do leku, aby oddziaływania pomiędzy matrycą i lekiem były jak największe. Stosowane są oddziaływania elektrostatyczne polegające na przyciąganiu się różnoimiennych ładunków nanożelu i zakumulowanego leku jak i również oddziaływania hydrofobowe związane z charakterem chemicznym wprowadzanej substancji.

W literaturze można znaleźć wiele przykładów fizycznej akumulacji leków do nanożeli. Oddziaływania hydrofobowe zostały wykorzystane do fizycznej akumulacji insuliny do nanożelu na bazie pullanu i cholesterolu. Po akumulacji otrzymano stabilny koloid o średnicy cząstek między 20-30 nm. Tego typu nośnik chronił lek przed degradacją enzymatyczną [208]. Oddziaływania hydrofobowe zostały wykorzystane również do akumulacji siRNA wewnątrz

nanożeli opartych na kwasie hialuronowym (HA). Terapeutyczne RNA zostało zakumulowane podczas procesu polimeryzacji emulsyjnej dzięki obecności hydrofobowych łańcuchów w sieci nanożeli. Jednak tego typu fizyczne wiązanie cząsteczek RNA okazało się mało wydajne. Stopień obciążenia nanożelu substancją bioaktywną wynosił zaledwie 10% [209].

Oddziaływania elektrostatyczne zostały wykorzystane między innymi do sprzęgania nanożeli z cząsteczkami kwasów nukleinowych. Zsyntezowane zostały nanożele na bazie poli(metaakrylanu glicydyłu) zmodyfikowanego etylenodiaminą. W celu zwiększenia transfekcji pDNA i siRNA wprowadzono dodatkowo naturalny przeciwutleniacz kwas liponowy i sieciowano nanożel za pomocą redukujących wiązań disiarczkowych. Zsyntezowane nanożele skupiały na sobie ładunek dodatni, co umożliwiło elektrostatyczną akumulację kwasów nukleinowych posiadających ładunek ujemny. Wykazano zwiększoną akumulację materiału genetycznego wewnątrz nanożeli zmodyfikowanych etylenodiaminą w stosunku do tych niezmodyfikowanych. Nanożele dostarczały siRNA z wysoką wydajnością do komórek wątroby i wykazały proliferację obecnych tam komórek nowotworowych. Praca ta wykazała, że redukujące nanocząstki kationowe zawierające kwas liponowy są wysoce konkurencyjne do wysoko wydajnych układów dostarczania kwasów nukleinowych [210].

Ostatnim typem modyfikacji nanożeli materiałem biologicznym jest samoorganizacja. Polega ona na samoistnym układaniu się nanocząstek opartych na polielektrolitach z przeciwnie naładowanymi biocząsteczkami. Samoorganizacja jest procesem, w którym składniki biologiczne organizują się poprzez dyfuzję w strukturze polimerowej i tworzą stabilne agregaty. Interakcje pomiędzy matrycą a cząsteczkami biologicznymi są słabe, jednak, ze względu na dużą ich liczbę, mają wpływ na właściwości strukturalne i konformacyjne otrzymanego biokonjugatu [211]. Przykładem tego typu procesu może być nanokompozytowy materiał zbudowany z hydrofilowych sieci polimerów niejonowych i kationowych. Nanożele te składały się z poli(tlenku etylenu) i poli(etylenoiminy) z anionowym środkiem powierzchniowo czynnym. Tego typu nanosystemy posłużyły do samoorganizacji, wewnątrz ich struktury, trudno rozpuszczalnych cząsteczek kwasu reinowego (RA) i indometacyny. Unieruchomienie w nich cząsteczek biologicznych było możliwe dzięki oddziaływaniom elektrostatycznym pomiędzy ujemnie naładowanymi cząsteczkami amfifilowymi kwasu a polikationowymi łańcuchami nanożelu jak i oddziaływaniom hydrofobowym cząsteczek leku przyłączonego do niepolarnych kompleksów wewnątrz sieci. Tego typu samoorganizujące się materiały łączą ze sobą właściwości nanocząstek jak i kompleksów polimerowo-surfaktantowych. Wykazują one alternatywę dla miceli polimerowych szeroko stosowanych w biomedycynie do dostarczania leków o charakterze amfifilowym [212].

Innego typu przykładem samoorganizacji może być samoistne tworzenie się nanożeli z kwasu hialuronowego sprzężonych z hydrofobowym lekiem przeciwbakteryjnym tetradecyloaminą. Ze względu na amfifilowy charakter kwasu zaobserwowano samoistne tworzenie się koniugatów kwasu i leku w fazie wodnej. Średni rozmiar nanocząstek ulegał zmniejszeniu wraz ze wzrostem ilości tetradecyloaminy, co wskazywało, że większa ilość ugrupowań hydrofobowych w koniugacie umożliwia tworzenie wewnętrznych hydrofobowych rdzeni. Tego typu koniugaty mogą tworzyć się w warunkach dużego rozcieńczenia, zachowując swoją strukturę micelną. Ma to duże znaczenie w wykorzystaniu ich jako nośników leków, które zanim osiągną miejsce docelowe ulegają silnemu rozcieńczeniu w płynach ustrojowych [213].

5. Oligonukleotydy w systemach kontrolowanego dostarczania leków

Oligonukleotydy, czyli krótkie fragmenty kwasów nukleinowych są narzędziem szeroko stosowanym w bioinżynierii i biomedycynie. W komórkach żywych istnieją dwa rodzaje kwasów nukleinowych: kwas dezoksyrybonukleinowy (DNA) oraz kwas rybonukleinowy (RNA). DNA może występować w postaci jednociowej (ssDNA) jak i w postaci dwuniciowej (dsDNA). Natomiast RNA w zależności od pełnionej funkcji może występować jako: *r*RNA - budujący rybosomy, *m*RNA - będący matrycą do produkcji białek oraz *t*RNA - transportujący aminokwasy do procesu translacji białek. Istnieją również migrujące formy kwasów nukleinowych takie jak: transpozony - dwuniciowe krótkie odcinki DNA oraz *si*RNA, który powstaje z RNA wirusowego i pełni funkcję wyciszania genów [214].

W medycynie wykorzystuje się przede wszystkim do regulacji ekspresji genów w tzw. terapii genowej jak i również jako elementy konstrukcyjne nośników leków. Oligonukleotydy posiadają unikalne właściwości takie jak: efekt komplementarności zasad, możliwość denaturacji i renaturacji, możliwość zmiany konformacji oraz możliwość powielania. Mogą również zmieniać swoją strukturę pod wpływem działania warunków środowiskowych. Pozwala to na tworzenie z ich udziałem matryc zdolnych do odpowiedzi na zadane bodźce. Jako cząsteczki pochodzenia naturalnego charakteryzują się wysoką biogodnością, dobrą rozpuszczalnością w środowisku wodnym oraz względną stabilnością w warunkach fizjologicznych [215].

Nanotechnologia kwasów nukleinowych polega na tworzeniu złożonych obiektów przestrzennych o kontrolowanych właściwościach przy użyciu zasady komplementarności

zasad i z zachowaniem podstawowych praw Watson'a i Crick'a. Istnieją różne strategie „nanodesignu” kwasów nukleinowych, takie jak: [216]

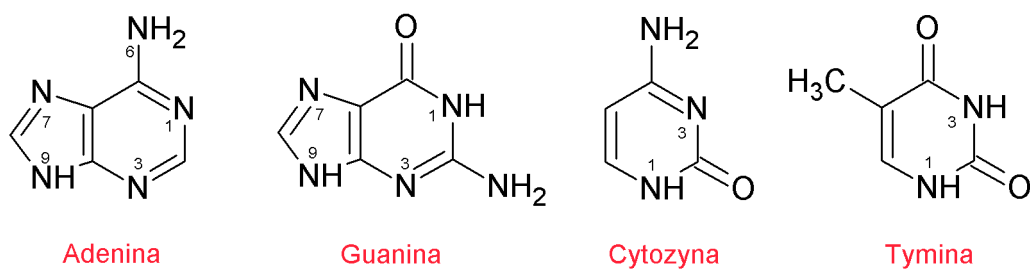
- tworzenie nanostruktur przy użyciu jednoniciowych fragmentów DNA o konkretnych wybranych sekwencjach zasad azotowych,
- tworzenie nanokonstrukcji przy użyciu przestrzennie ułożonych linowych dwuniciowych cząsteczek DNA lub ich kompleksów,
- łączenie oligonukleotydów z innymi materiałami budulcowymi do konstrukcji wielozadaniowych matryc,
- łączenie oligonukleotydów z ligandami i tworzenie biokoniugatów.

Aby zrozumieć zasady inżynierii kwasów nukleinowych należy szczegółowo poznać ich strukturę wewnętrzną oraz właściwości. W kolejnych podrozdziałach zostanie przybliżona budowa struktury DNA i jego podstawowe właściwości, które pozwolą na szersze spojrzenie na materiał genetyczny pod kątem kontrolowanego uwalniania leków.

5.1. Budowa DNA

Okrycie struktury DNA przez James'a D. Watson'a oraz Francis'a Crick'a było kamieniem milowym w poznaniu procesów zachodzących w organizmie oraz stało się podstawą współczesnej bioinżynierii kwasów nukleinowych. W organizmie ludzkim DNA pełni rolę magazynu informacji dla każdej żywej komórki. Jego specyficzna budowa pozwala na przetwarzanie informacji genetycznej w procesach biochemicznych takich jak transkrypcja czy translacja.

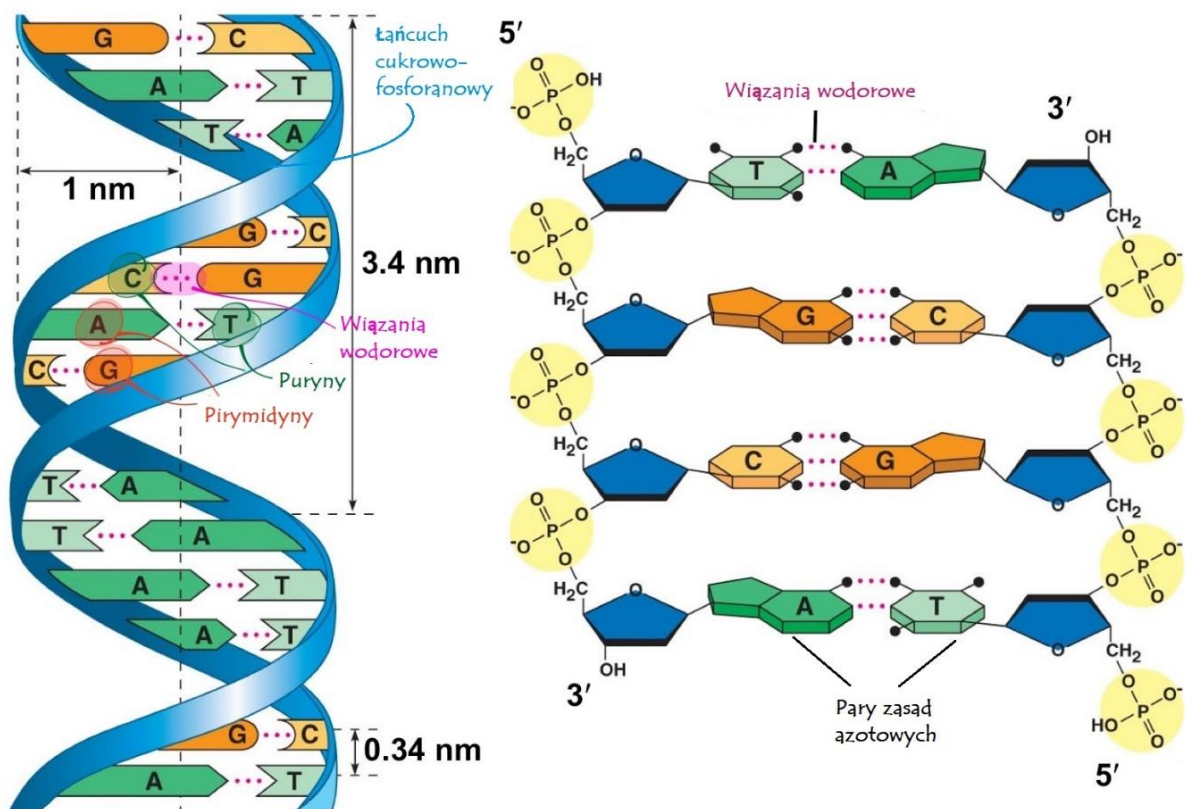
Kwas dezoksyrybonukleinowy jest liniowym biopolimerem zbudowanym z monomerów zwanych nukleotydami. DNA w jądrze komórkowym występuje w postaci dwuniciowej helisy (dsDNA), która składa się ze skręconych antyrównolegle względem siebie łańcuchów polinukleotydowych. Nukleotydy zbudowane są z kolei z zasady azotowej, cukru (2'-dezoksy-D-rybozy) oraz reszty fosforanowej. Obecne w nukleotydach zasady azotowe ze względu na swoją budowę zostały podzielone na dwie grupy: puryny składające się ze sprzężonych dwóch pierścieni węglowo-azotowych oraz pirymidyny zawierające pojedyncze pierścienie węglowo-azotowe. Tylko dwie puryny: adenina (A) i guanina (G) oraz dwie pirymidyny: tymina (T) i cytozyna (C) występują w DNA. Są one przedstawione na rysunku 11 [217].



Rys. 11. *Zasady azotowe obecne w DNA.*

Reszty cukrowe i fosforanowe w nukleotydach połączone są ze sobą wiązaniami 3' - 5' fosfodiestrowymi tworząc ujemnie naładowany łańcuch cukrowo - fosforanowy. Pomiędzy łańcuchami cukrowo - fosforanowymi przebiegają helikalnie dwie bruzdy, tzw. rowki: mała o szerokości 6 Å i duża o szerokości 12 Å. Zasady azotowe skierowane są do wnętrza helisy i tworzą komplementarne pary: adenina - tymina (A-T) i guanina - cytozyna (G-C). Komplementarne zasady azotowe połączone są ze sobą za pomocą wiązań wodorowych i oddziaływań hydrofobowych, które mogą tworzyć się tylko w parach puryna - pirymidyna. Adenina z tyminą połączone są wiązaniem podwójnym natomiast cytozyna z guaniną potrójnym, co zasadniczo wpływa na siłę ich oddziaływań [218].

Łańcuchy polinukleotydowe DNA są owinięte wokół siebie w sposób helikalny tworząc dwuniciową helisę. Należy podkreślić, że podwójna helisa DNA jest obiektem nano. Średnica cząsteczki wynosi ok. 2 nm, a odległość między parami zasad 0,34 nm. Na jeden skręt helisy przypada około 10 par zasad azotowych, a więc całkowity rozmiar jednego skrętu helisy wynosi około 3,5 nm. Polinukleotydy mają zawsze dwa końce: tj. koniec -5' występujący przy 5 atomie węgla deoksyrybozy i koniec -3' występujący przy 3 atomie węgla. Na rysunku 12 przedstawiono szczegółową strukturę podwójnej helisy DNA.



Copyright © 2008 Pearson Education, Inc., publishing as Pearson Benjamin Cummings.

Rys. 12. *Struktura podwójnej helisy DNA [219].*

Przy analizie budowy DNA należy wspomnieć o centralnym dogmacie biologii molekularnej [220]. Treścią tego dogmatu jest transfer informacji genetycznej. Według niego informacje zawarte w DNA są przepisywane na jednoniciowe RNA (transkrypcja). Następnie, przy udziale rybosomów, RNA bierze bezpośrednio udział w syntezie białek poprzez proces translacji. DNA może ulegać również procesowi replikacji, w którym następuje powielenie materiału genetycznego, co ma fundamentalne znaczenie w podziale komórek. W procesie replikacji, po oddzieleniu się od siebie dwóch łańcuchów, następuje tworzenie łańcuchów komplementarnych; sekwencja jednej nici determinuje sekwencję nici komplementarnej. Oprócz wyżej wymienionych procesów DNA może ulegać zmianom strukturalnym w procesach denaturacji, renaturacji, hybrydyzacji jak i również transfekcji i transpozycji.

Struktura przestrzenna dwuniciowej cząsteczki DNA zależy ściśle od sekwencji bazowej. Różnice w organizacji przestrzennej, spowodowane obecnością różnych par w łańcuchu, prowadzą do zmian względnej orientacji cząsteczki. Do tej pory, przy pomocy techniki dyfrakcji rentgenowskiej wyizolowano kilka różnych form przestrzennych dsDNA,

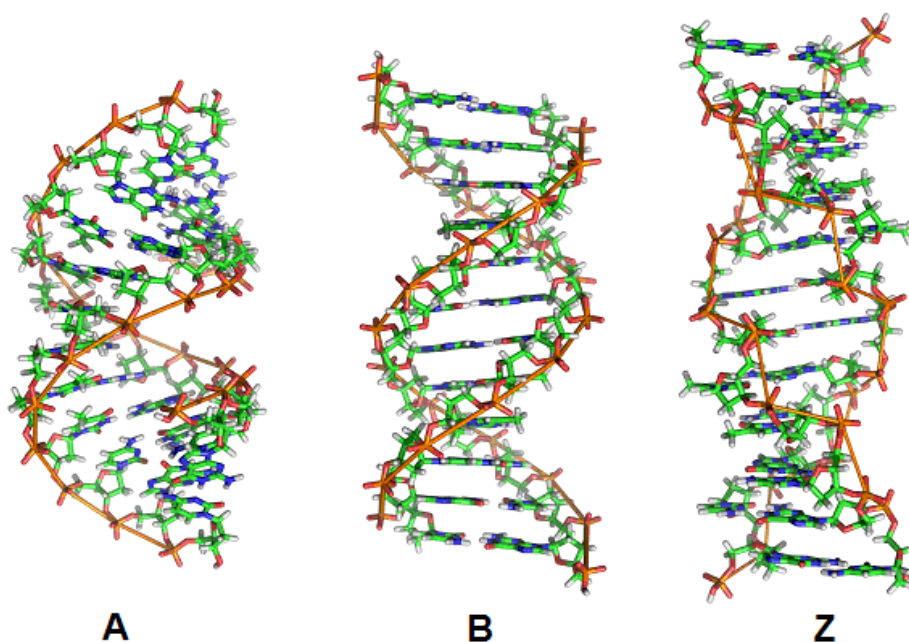
które cechują się strukturą helikalną. Zasadniczo wyróżniamy dwie prawoskrętne helisy - formy B i A oraz lewoskrętną helisę - formę Z [221].

dsDNA głównie występuje w swojej kanonicznej formie określanej jako konformacja B-DNA. Struktura ta charakteryzuje się występowaniem 10 par zasad na jeden skręt helisy, ułożonych wokół osi i niemal do niej prostopadłych. Jeden pełny skręt helisy ma wysokość 34 Å, natomiast średnica helisy wynosi 23,7 Å. W tej konfiguracji charakterystyczne jest występowanie dwóch rowków: większego i mniejszego.

Drugą prawoskrętną konformacją DNA jest A-DNA, która występuje zazwyczaj w warunkach niskiej wilgotności. W porównaniu do B-DNA struktura A-DNA jest szersza i krótsza, a pary zasad nachylone są do osi helisy pod kątem 20°. Na pełny skręt helisy przypada 11 par zasad i ma on 25 Å wysokości. Natomiast średnica helisy wynosi 25 Å. W stosunku do drugiej prawoskrętnej formy, A-DNA posiada znacznie płytsze rowki. Konformacja ta występuje głównie w strukturze RNA jak i również hybrydach DNA - RNA.

Trzecią formą jest helisa lewoskrętna Z - DNA. W jej sekwencji występują naprzemiennie nukleotydy purynowe posiadające wiązania glikozydowe w konformacji syn oraz pirymidynowe zawierające wiązania glikozydowe w konformacji anti. Z-DNA jest najmniej skręconą formą DNA (12 par zasad na jeden skręt), a swoją nazwę zawdzięcza zygzakowatemu ułożeniu obwodowych łańcuchów cukrowo-fosforanowych. W tej formie DNA pary zasad odchyłone są od osi helisy o kąt 10°, skok helisy wynosi 45,6 Å, natomiast średnica 18,4 Å. Forma ta posiada tylko jedną małą, wąską bruzdę. Konformacja Z-DNA tworzy się w przypadku skrajnie małej ilości rozpuszczalnika bądź w obecności wysokiego stężenia soli lub specyficznych kationów. Badania na przełomie ostatnich lat wykazały, że forma ta pełni istotną funkcję przy inicjacji transkrypcji DNA.

Zasadniczo, oprócz szczegółowo opisanych powyżej konformacji występują również mniej popularne formy strukturalne. Są to między innymi prawoskrętne formy DNA: C, D, E, i T, które przypominają strukturę B-DNA, jednak posiadają pewne defekty i odchylenia. Ze względu na to, że łańcuchy polinukleotydowe nie są strukturami sztywnymi; mogą tworzyć liczne zagięcia i przyjmować struktury tzw. spinki do włosów i superhelikalnych skrętów. Struktury przestrzenne opisanych powyżej form DNA przedstawiono na rysunku 13.



Rys. 13. *Formy dwuniciowego DNA (A, B, Z) przedstawione w wybranej płaszczyźnie równoległej do osi helisy.*

Jak już wspomniano, najczęściej występująca formą w komórkach żywych jest B-DNA. Jednak w zależności od warunków środowiskowych może ona ulec przekształceniu w inną konfigurację. W zależności od wilgotności i stężenia jonów metali, DNA może występować w różnych formach krystalicznych odpowiadających danym konformacjom. Zmiany konformacyjne w strukturze DNA mają duże znaczenie w naturalnych procesach przekształcania się DNA, a dynamika tych zmian związana jest często z dopasowaniem się molekuł w miejscach zwanych rowkami. Różnice w wielkości oraz głębokości rowków w poszczególnych konformacjach DNA mogą mieć znaczący wpływ na oddziaływania substancji aktywnych z podwójną helisą. W rowkach obecne są grupy funkcyjne oraz atomy, które posiadają zdolności do wiązania jonów, a także cząsteczek wody poprzez wiązania wodorowe. Przyłączanie się substancji czynnych do rowków w DNA następuje często na skutek zastępowania molekuł wody tymi związkami chemicznymi [222].

5.2. Czynniki powodujące zmiany struktury DNA

Molekuła DNA pod wpływem wewnętrznych napięć torsyjnych może ulegać zmianom związanym z lokalnym rozluźnianiem lub kondensacją struktury helisy. Tego typu napięcia mogą powstawać w wyniku naturalnych procesów takich jak: replikacja, transkrypcja czy naprawa DNA. Helisa DNA może być również modyfikowana w procesach mutacji na skutek:

tranzykcji, transwersji, insercji lub delecji zasad azotowych wewnątrz nici. Podczas tego typu procesów następuje zmiana sekwencji, konformacji jak i również długości helisy.

Na zmiany struktury DNA wpływają również warunki zewnętrzne, które można podzielić na czynniki fizyczne, chemiczne oraz biologiczne. Czynniki te oddziałują bezpośrednio z DNA i mogą powodować modyfikacje w strukturze nukleotydów i zmiany w sekwencji zasad azotowych [223].

Czynniki fizyczne powodujące zmiany w strukturze DNA to między innymi promieniowanie X, α , β , γ , UV oraz hipertermia. Promieniowanie jonizujące powoduje zrywanie wiązań wodorowych, a w konsekwencji pękanie DNA oraz niszczenie zasad azotowych i łańcuchów cukrowo – fosforanowych. Uszkodzenia te następują poprzez wybijanie elektronów z cząsteczek kwasów nukleinowych. W następstwie tego występuje jonizacja i nagromadzenie reaktywnych form wolnych rodników inicjujących reakcje wolnorodnikowe uszkadzające DNA. Szacuje się, że po zadziałaniu na komórki promieniowaniem γ o wielkości dawki 1Gy dochodzi do powstania ok. 600 - 1000 pęknięć w ssDNA, 26-40 przerw w dsDNA i 250 uszkodzeń tyminy [224].

Kolejny rodzaj promieniowania wpływającego bezpośrednio na strukturę DNA to promieniowanie UV. Posiada ono znacznie niższą energię w stosunku do promieniowania jonizującego, jednak jest ono efektywnie pochłaniane przez cząsteczki materiału genetycznego. Po ekspozycji DNA na promienie UV następuje tworzenie się dimerów pirymidynowych C-C i C-T oraz dimerów T-T pomiędzy atomami C5 i C6 jednej reszty pirymidynowej a atomami węgla drugiej pirymidyny. W wyniku tych działań powstaje pierścień cyklobutanowy, który powoduje odkształcenia w łańcuchu cukrowo-fosforanowym. W konsekwencji prowadzi to do delecji powstałego dimeru oraz lokalnego pęknięcia i rozwijania się cząsteczki dsDNA.

Ostatnim fizycznym czynnikiem, powodującym zmiany w DNA jest wysoka temperatura. Lokalne nagrzewanie cząsteczek DNA powoduje zrywanie wiązań wodorowych pomiędzy zasadami azotowymi i w konsekwencji denaturację podwójnej nici DNA. Hipertermia jest szeroko stosowana w terapiach przeciwnowotworowych poprawiając znacząco efekty działania radio- i chemioterapii. Synergiczne działanie tych terapii opiera się na mechanizmach hamowania mechanizmów naprawczych cząsteczek DNA powstałych po uszkodzeniach popromiennych. Wysoka temperatura wpływa również na indukcję degradacji białek towarzyszących, co wiąże się z hamowaniem naprawy DNA opartej na rekombinacji homologicznej pęknięć w dsDNA [225].

Czynniki chemiczne powodujące zmiany strukturalne wewnątrz cząsteczek DNA to związki chemiczne takie jak: kwasy, zasady, aminy (np.: hydroksyamina), analogi zasad

azotowych, związki alkilujące, barwniki akrydynowe, wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne, a także reaktywne formy tlenu [226].

Przykładem kwasu powodującego mutacje w DNA jest kwas azotowy (III). Jego działanie polega na dezaminacji zasad azotowych. W wyniku dezaminacji powstają następujące zmiany: cytozyna - uracyl, guanina - ksantyna i adenina - hipoksantyna.

Do przedstawicieli związków alkilujących można zaliczyć między innymi dietylowe i etylometylowe sulfoniany, metylosulfoniany, etylnitrozomocznik i diepoksybutan. Obecność w tych związkach grup metylowych powoduje alkilację zasad azotowych. Największą podatnością na alkilację charakteryzują się kolejno: atom azotu N7 guaniny, atom N1 guaniny, N1 i N3 adeniny oraz N3 cytozyny. Pod wpływem działania tych związków obserwowane są liczne tranzycje i transwersje w obrębie nici DNA [227].

Kolejnym czynnikiem chemicznym są analogi zasad azotowych, czyli substancje strukturalnie podobne do zasad występujących w DNA, np. 2-aminopuryna i 5-bromouracyl. Dzięki temu podobieństwu mogą być zamiennie wbudowywane w procesie replikacji do struktury DNA. W konsekwencji powodują mutacje na skutek niewłaściwego parowania zasad.

Duże znaczenie wśród czynników chemicznych mają również barwniki akrydynowe, które wnikają pomiędzy pary zasad azotowych w DNA powodując ich rozsuniecie. Do tej grupy możemy zaliczyć między innymi: oranż akrydyny, proflawinę oraz akryflawinę. Innego typu interkalującym barwnikiem jest bromek etydyny składający się z czterech pierścieni, stosowany powszechnie do wybarwiania DNA. Interkalacja tego typu barwników wywołuje deformacje w matrycy DNA, co prowadzi do błędów w replikacji a w rezultacie delekcji lub insercji pojedynczych par nukleotydów.

Z kolei wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne takie jak benzopiren czy benzoantracen powodują tworzenie się adduktów z DNA. Związki te zaliczane są do promutagenów, czyli substancji ulegających przekształceniom metabolicznym w organizmie w aktywne formy – mutageny. Addukty z DNA tworzą także niektóre heterocykliczne aminy aromatyczne powstające podczas pirolizy aminokwasów.

Nie można zapomnieć również o dużym wpływie wolnych rodników obecnych w organizmie na zmiany w strukturze DNA. Główną formą rodnika powodującą uszkodzenia oksydacyjne cząsteczek DNA jest rodnik hydroksylowy. Jego elektrofilowy charakter powoduje dwa typy zmian: reakcję addycji z wiązaniami π zasad azotowych oraz dehydratację cząsteczek deoksyrybozy. Dodatkowo, generowanie reaktywnych rodników tlenowych może doprowadzić do powstawania wiązań poprzecznych między DNA a białkami towarzyszącymi.

Rodnik hydroksylowy może również reagować z pierścieniami deoksyrybozy, powodując oderwanie atomów wodoru związanych z cząsteczką cukru [228].

Zmiany w obrębie struktury DNA mogą wykazywać również niektóre leki takie jak: cytostatyki, antybiotyki czy leki psychotropowe. Pod wpływem tych substancji następuje zerwanie wiązań wodorowych, pękanie zasad, zmiany konformacji oraz innego typu mutacje strukturalne.

Oprócz wymienionych powyżej czynników chemicznych i fizycznych na strukturę DNA mogą mieć również wpływ czynniki biologiczne. Czynnikiem tego typu są najczęściej wirusy, wiroidy, bakterie i transpozony, których materiał genetyczny może zostać wbudowany w cząsteczkę kwasu nukleinowego w wyniku procesów transfekcji i transdukcji [229].

5.3. Oddziaływania DNA z lekami antracyklinowymi

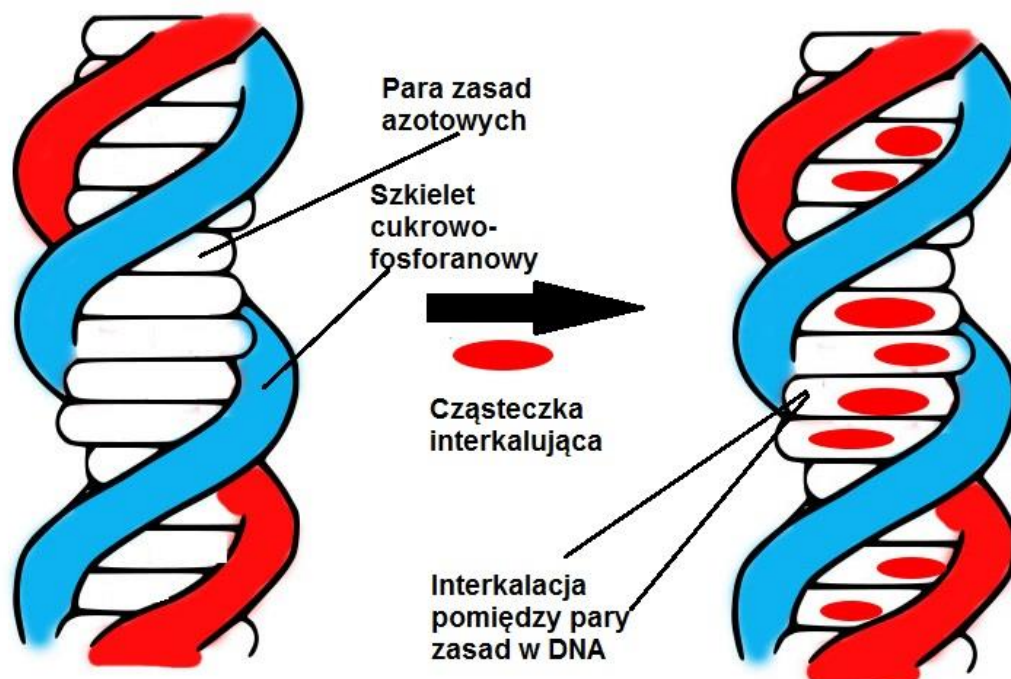
Właściwości lecznicze znacznej części dotychczas stosowanych terapeutów wiążą się bezpośrednio z oddziaływaniem z DNA. Na aktywność biologiczną leku w miejscu związania wpływa przede wszystkim specyficzność sekwencyjna wiązania oraz kinetyka asocjacji. Istnieje kilka sposobów oddziaływania cząsteczek leków z helisą DNA. Są to:

- interkalacja,
- bisinterkalacja,
- wiązanie w małym rowku,
- wiązanie w dużym rowku,
- wiązanie kowalencyjne (alkilacja),
- niespecyficzne wiązanie na zewnątrz nici.

W swojej pracy skupiłam się na oddziaływaniach leków poprzez interkalację pomiędzy pary zasad DNA. W związku z tym przybliżę dokładnie mechanizm tego typu oddziaływań.

Termin interkalacja wywodzi się od łacińskiego słowa *intercalare*, co w dosłownym znaczeniu oznacza „wsuwać się”. Określa ona, zatem wsuwanie się płaskich heterocyklicznych pierścieni aromatycznych pomiędzy pary zasad podwójnej helisy DNA. Są to wiązania typu niekowalencyjnego, w których lek utrzymywany jest sztywno w położeniu prostopadłym do osi spirali. Leki wnikać do wnętrza struktury DNA w taki sposób nazywamy interkalatorami. Podczas tworzenia kompleksu z DNA interkalatory ustawiają się prostopadle do osi helisy i równolegle do płaszczyzny par zasad. Kompleks ten stabilizowany jest wiązaniami hydrofobowymi oraz oddziaływaniami π - π orbitali chromoforu i zasad azotowych. Związki

interkalujące preferują sekwencje zasad, w których występuje przewaga par G-C [230]. Proces interkalacji został zilustrowany na rysunku 14.



Rys. 14. Schemat interkalacji cząsteczki pomiędzy zasady azotowe w DNA.

W następstwie interkalacji następują zmiany w trzeciorzędowej strukturze DNA z zachowaniem nienaruszonej struktury pierwszo- i drugorzędowej. Zmiany w strukturze trzeciorzędowej związane są z pionowym rozsunięciem par zasad, wydłużeniem cząsteczki i częściowym zdeformowaniem łańcucha cukrowo - fosforanowego. Podczas interkalacji wiązania wodorowe pomiędzy zasadami w ich parach zasadniczo zostają nienaruszone. Jednak struktura helikalna DNA zostaje naruszona, co może prowadzić do lokalnego rozplatania się nici. To częściowe rozkręcanie się helisy powoduje zmiany w kącie skręcenia, który w stosunku do standardowej helisy różni się o $10 - 26^\circ$. Zmianie ulegają również odległości pomiędzy sąsiadującymi parami zasad; zwiększają się one średnio z $3,4 \text{ \AA}$ do $7,8 \text{ \AA}$. Inną ważną konsekwencją interkalacji jest utrata zdolności DNA do replikacji i transkrypcji [231].

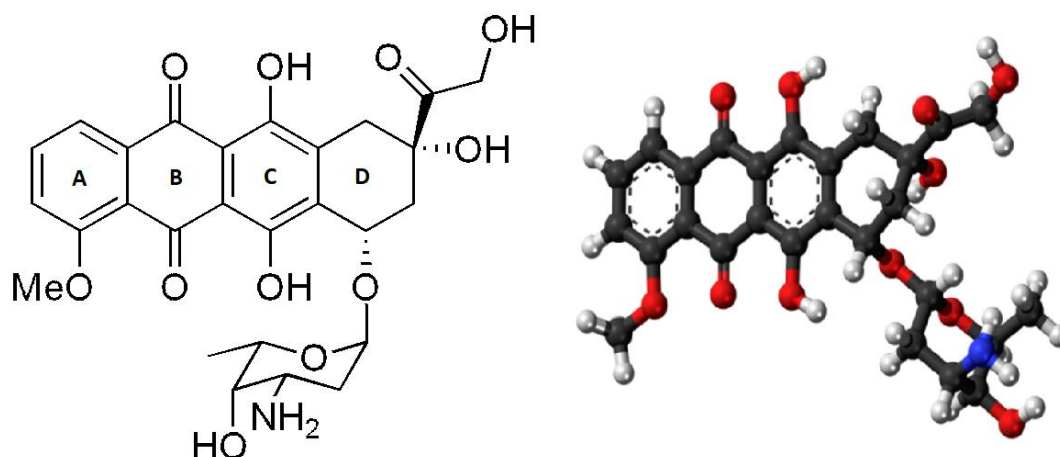
Związki interkalujące DNA muszą spełniać szereg warunków związanych z ich budową wewnętrzną. Przede wszystkim muszą być zbudowane z 3 do 4 pierścieni aromatycznych tworzących płaską cząsteczkę, której powierzchnia nie przekracza $0,28 \text{ nm}^2$ a wysokość $0,34 \text{ nm}$. Do tej pory poznano kilka grup leków – interkalatorów. Są to między innymi: aktynomycyny, akrydyny, związki antrachinonowe, pochodne mitoksantonu i antracykliny [232].

Antybiotyki antracyklinowe są grupą interkalatorów szeroko stosowaną w terapiach przeciwnowotworowych. Ich naturalne formy izoluje się z grzybów *streptomyces*, a następnie modyfikuje w ramach różnego typu syntez chemicznych. Zbudowane są z policyklicznego antrachinonu - układu aromatycznego i hydrofobowego oraz z hydrofilowej reszty aminocukrowej. Ze względu na budowę chemiczną antracykliny możemy podzielić na:[233]

- **antracykliny I klasy**, które posiadają układ hydrochinonu w pierścieniu B aglikonu i boczny łańcuch w pozycji C13 pierścienia A oraz monosacharydową resztę cukrową np. doksorubicynę, daunorubicynę czy epirubicynę.
- **antracykliny II klasy**, które w swojej budowie posiadają monofenolową grupę w pierścieniu B, łańcuch alkilowy w pierścieniu A aglikonu oraz polisacharydową resztę cukrową z wiązaniami *o*- glikozydowymi, np.: akklarubicynę i marcellomycynę.

Mechanizm działania antracyklin jest skomplikowany, jednak wiadomo, iż ich głównym celem jest atak na DNA. Występowanie płaskich pierścieni w ich strukturze warunkuje interkalację pomiędzy pary zasad DNA i blokadę procesu transkrypcji poprzez inhibicję topoiizomerazy II jak i również wytwarzanie wolnych rodników. Mechanizm ich działania zależy ściśle od stężenia leku, czasu jego działania oraz różnic w strukturze poszczególnych cząsteczek antracyklin. Przy niskich stężeniach leku dochodzi głównie do interkalacji lub wytworzenia wiązań kowalencyjnych. Natomiast przy wysokich stężeniach indukowane jest wytwarzanie wolnych rodników warunkujących apoptozę komórek. Ważną rolę w stabilizacji kompleksów interkalacyjnych antybiotyków antracyklinowych z DNA odgrywają oddziaływania warstwowe między chromoformami antracyklin a zasadami azotowymi. Badania krystalograficzne wykazały, że dwie najbardziej popularne antracykliny: doksorubicyna (Dox) i daunorubicyna (DRB) tworzą kompleksy interkalacyjne z DNA w miejscach 5'-GC-3' i 5'-CG-3' [234].

Doksorubicyna (Dox) została wyizolowana po raz pierwszy w 1970 roku z bakterii *Streptomyces peucetius* var. *Caesiu*. Należy do najbardziej skutecznych cytostatyków stosowanych w terapiach przeciwnowotworowych układu krwionośnego, tarczycy, wątroby, jajnika, płuc, jądra, pęcherza moczowego oraz guzów litych. Składa się z tertacyklicznego pierścienia (A, B, C, D), gdzie pierścień D połączony jest wiązaniem glikozydowym z aminocukrem daunozaminą. Strukturę doksorubicyny przedstawia rysunek 15 [235].



Rys. 15. Wzór strukturalny i budowa cząsteczki doksorubicyny.

Mechanizm działania doksorubicyny i pozostałych antracyklin jest podobny. Po interkalacji cząsteczki pomiędzy pary zasad DNA następuje zahamowanie aktywności enzymów niezbędnych do syntezy kwasów nukleinowych, a zatem zahamowanie replikacji i transkrypcji. W konsekwencji dochodzi do zahamowania namnażania komórek i zatrzymania cyklu komórkowego w fazie G2/M. Drugi możliwy mechanizm polega na wytworzeniu wolnych rodników dzięki obecności w cząsteczce ugrupowania chinonowego i hydrochinonowego. W związku z tym doksorubicyna może ulegać procesowi jednoelektronowej redukcji chinonu do hydrochinonu [236].

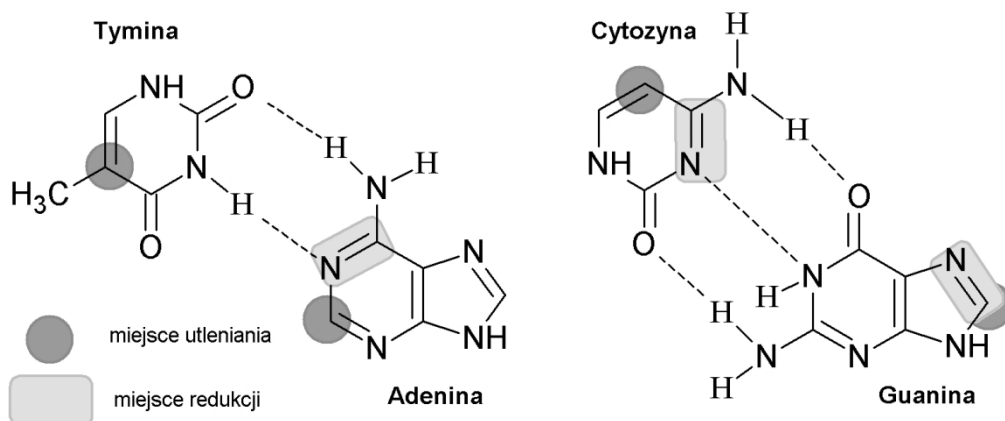
Niezależnie od wielu sukcesów terapeutycznych, stosowanie doksorubicyny wywołuje szereg skutków ubocznych u pacjenta. Są to m.in.: wypadanie włosów i zaburzenia jelitowo-żołądkowe. Najgroźniejsza jest jednak wysoka kardiotoxyczność [237]. W związku z powyższym, pojawiło się wyzwanie dla naukowców: trzeba skonstruować odpowiednie nośniki dla leku, które zmniejszą toksyczność ustrojową leku przy jednoczesnym zachowaniu efektu terapeutycznego [238].

5.4. Detekcja DNA

Oznaczanie kwasów nukleinowych opiera się w głównej mierze na określeniu zawartości jednego ze składników wchodzących w skład kwasu nukleinowego, a więc kwasu fosforowego, deoksyrybozy i zasad azotowych. Do oznaczania używa się różnych metod instrumentalnych. Najbardziej popularne metody to metody spektroskopowe i elektrochemiczne. Będą one szczegółowo omówione w kolejnych podrozdziałach.

5.4.1. Metody elektrochemiczne

W ostatnich czasach metody elektrochemiczne stały się popularne w detekcji kwasów nukleinowych jak również w badaniach ich oddziaływań z różnymi ligandami i lekami. Pierwsze wzmianki o elektroaktywności DNA ukazały się na przełomie lat 50-tych i 60-tych ubiegłego wieku [239]. Jednak największy rozkwit metod elektrochemicznych w analizie DNA nastąpił w latach 90-tych. Wykazano, iż molekula DNA posiada miejsca elektroaktywne, które mogą brać udział w reakcjach utleniania i redukcji (rysunek 16)



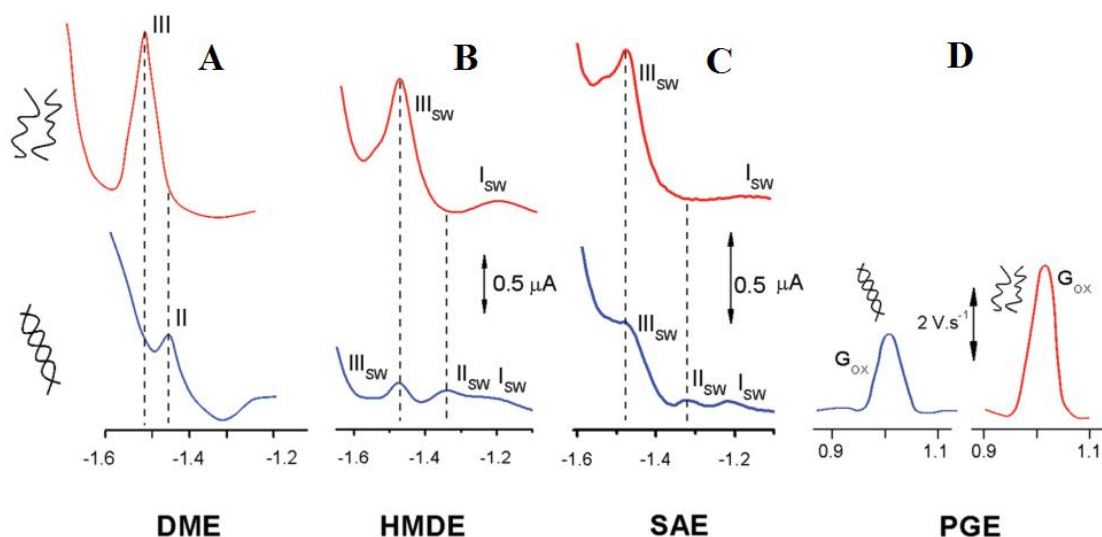
Rys. 16. Miejsca elektroaktywne w zasadach azotowych DNA [240].

Wykazano również, że deoksyryboza i reszty kwasu fosforanowego nie uczestniczą bezpośrednio w procesach redoks zachodzących w DNA [241].

Odkrycie elektroaktywności kwasów nukleinowych pozwoliło na wyznaczenie parametrów, przy jakich zachodzą procesy red-ox. Okazało się, że potencjały utleniania/redukcji zasad azotowych różnią się na tyle, że pozwalają na ich jakościową detekcję, natomiast wartości uzyskanych prądów pozwalają oznaczyć konkretne stężenia zasad azotowych biorących udział w reakcji redoks. Elektroredukcja zasad azotowych zachodzi przy znacznie ujemnych potencjałach, a procesy redukcji są całkowicie nieodwracalne. Natomiast utlenianie może mieć częściowo odwracalny charakter. Elektroaktywność zasad azotowych w DNA umożliwiła również monitorowanie zmian w strukturze dsDNA, uszkodzeń podwójnej helisy jak i badanie oddziaływań DNA z różnego typu związkami chemicznymi.

Do badań elektroaktywności DNA używano różnego typu elektrod; zarówno rtęciowych (HMDE) jak i wykonanych z podłoży stałych (złoto, srebro, platyna, materiały węglowe). Najczęściej stosowane były i są elektrody z materiałów węglowych takich jak: grafit pirolityczny (PGE), pasta węglowa (CPE), węgiel szklisty (GCE) oraz diament domieszkowany borem (BDD). Posiadają one dość szerokie okno potencjałowe, a ich powierzchnia robocza jest

łatwo odwracalna. Często elektrody węglowe poddawane są modyfikacjom, aby zwiększyć ich selektywność i wzmocnić sygnał uzyskiwany w procesach redoks. Na rysunku 17 zostały przedstawione sygnały elektroredukcji i elektROUTLENIANIA dwóch form DNA zarejestrowane na różnych elektrodach.



Rys. 17. Procesy elektroredukcji dsDNA (niebieska linia) i ssDNA (czerwona linia) mierzone różnymi technikami na elektrodach: (A) Polarografia pulsowa różnicowa DPP na kapiącej elektrodzie rtęciowej (DME); stężenie dsDNA 470 μ g/mL i ssDNA 50 μ g/mL (B) Woltamperometria fali prostokątnej SWV na wiszącej kropłowej elektrodzie rtęciowej (HMDE), (C) SWV na elektrodzie z amalgamatu srebra (SAE). Stężenie ss- i dsDNA 20 μ g/mL. (D) Elektrooutlenianie guaniny w ds- i ssDNA na elektrodach PGE - wykonanych z grafitu pirolitycznego, stężenie dsDNA 100 μ g/mL i ssDNA 50 μ g/mL. [242].

Patrząc na powyższe woltamperogramy można zaobserwować, że piki pochodzące od dwuniciowej formy DNA są mniej widoczne w stosunku do pików pochodzących od pojedynczych form kwasu nukleinowego. Związane jest to z mniej efektywnym transportem cząsteczek dsDNA do powierzchni elektrody oraz mniejszą dostępnością miejsc elektroaktywnych, związaną z efektami sterycznymi, w porównaniu do form jednoniciowych. W związku z tym, granica detekcji ssDNA jest dużo mniejsza w stosunku do dsDNA. Metody elektrochemiczne doskonale sprawdzają się w monitorowaniu denaturacji dsDNA. Podczas tego procesu można zaobserwować wzrost sygnałów elektroredukcji zasad azotowych (adeniny i guaniny) spowodowany zerwaniem wiązań wodorowych, dysocjacją dsDNA i co za tym idzie łatwiejszym transportem materiału genetycznego do elektrody.

Badanie procesów redoks zachodzących w DNA prowadzono z wykorzystaniem szeregu technik elektrochemicznych, takich jak: polarografia, woltamperometria z liniową

zmianą potencjału (LV), woltamperometria cykliczna (CV), woltamperometria pulsowa różnicowa (DPV), woltamperometria fali prostokątnej (SWV) i chronopotencjometria. Techniki pulsowe znacznie poprawiają jakość sygnałów poprzez eliminację prądów pojemnościowych i zwężenie pików. Dzięki temu możemy obserwować piki cytozyny i tyminy, które położone są przy bardziej dodatnich potencjałach, blisko końca okna potencjałowego. Z kolei woltamperometria cykliczna pozwala na rejestrowanie bezpośrednich wartości prądów utleniania, co umożliwia monitorowanie zmian strukturalnych i oddziaływań z lekami podwójnej helisy DNA [243].

5.4.2. Metody spektroskopowe

Kwasy nukleinowe ze względu na obecność heteroaromatycznych zasad absorbują światło UV; maksymalna absorbancja przypada na 260 nm. Związane jest to bezpośrednio z obecnością ugrupowań aromatycznych: purynowych i pirymidynowych, zawierających sprzężone wiązania podwójne oraz heteroatomy. Dodatkowo, zasady w kwasach nukleinowych oddziałują ze sobą powodując efekt hipochromowy (patrz rysunek 18). Dlatego też absorbancja podwójnej helisy DNA jest mniejsza od absorbancji jednoniciowej formy, która z kolei jest mniejsza od absorpcji wyizolowanych nukleotydów. Oznacza to, że absorbancja kwasów nukleinowych nie jest addytywną sumą absorbancji wszystkich zasad azotowych; jej rzeczywista wartość jest o około 40% niższa od wartości teoretycznie wyliczonej. Za pomocą spektroskopii możemy w prosty sposób monitorować procesy denaturacji i renaturacji helisy DNA. Częsteczki ssDNA, będące produktami denaturacji dwuniciowej struktury, silniej absorbują światło UV niż cząsteczki dwuniciowe, co skutkuje bezpośrednim wzrostem piku absorbancji po procesie denaturacji.

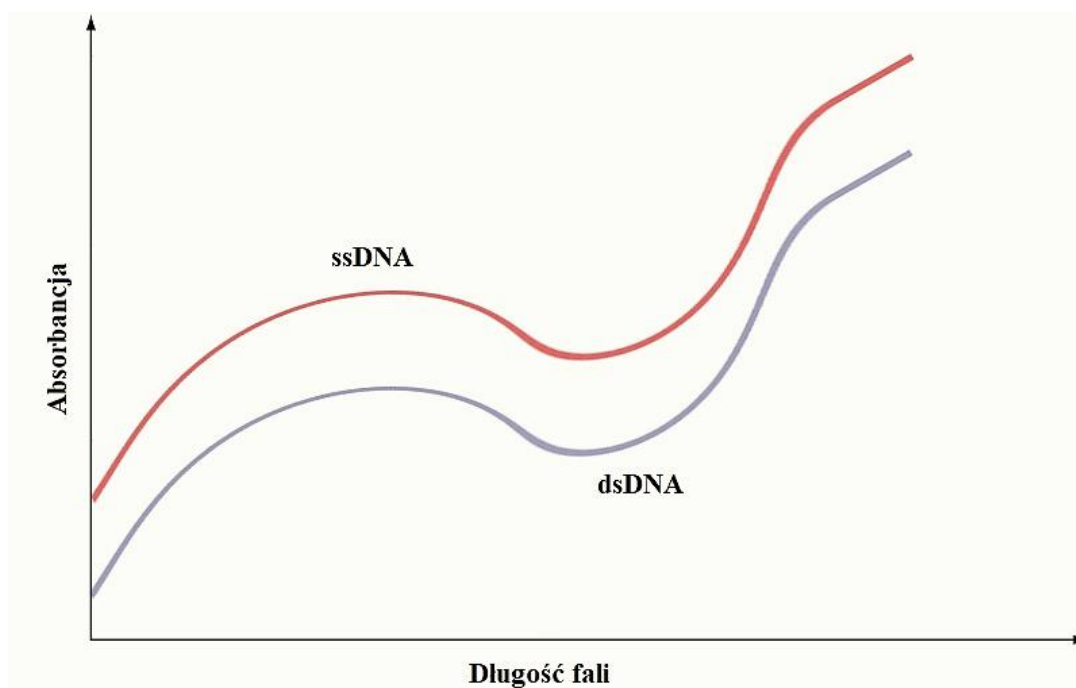
W pomiarach stężenia DNA za pomocą spektroskopii korzystamy z prawa Lamberta Beera. Korzystając z tego prawa stężenie DNA wyrażamy, jako:

$$c = \frac{A_{260}}{\epsilon l} \quad (1)$$

gdzie: c to stężenie w mol/dm³, A_{260} to absorbancja dla długości fali 260 nm, l – grubość warstwy absorbującej w cm i ϵ – molowy współczynnik absorpcji. Wartość współczynnika absorpcji wynosi $\epsilon = 6600 \text{ dm}^3\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

W analizie stężenia DNA przyjęto, że absorbancja przy długości fali 260 nm jest równa 1 gdy: dsDNA ma stężenie 50 µg/ml, ss DNA - 33 µg/ml, a stężenie RNA wynosi 40 µg/ml. Należy jednak pamiętać, że wartości te są przybliżone ze względu na to, iż wartość współczynnika ekstynkcji jest zależna od składu zasad azotowych obecnych w DNA.

Widmo UV-Vis DNA wykorzystuje się również do badania czystości próbek DNA. Czystość preparatu, a ściślej stopień zanieczyszczenia białkami oraz RNA jest określana przez stosunek A_{260}/A_{280} . Preparat DNA uznaje się za satysfakcjonująco czysty, jeżeli wartość ilorazu A_{260}/A_{280} mieści się w przedziale 1,8 - 2,0. W przypadku zanieczyszczenia cząsteczkami RNA wartość ilorazu jest wyższa od 2, natomiast w przypadku zanieczyszczeń białkami wartość jego jest niższa od 1,8. Zanieczyszczenia pochodzące od węglowodorów, fenolu lub białek można określić mierząc absorbancję przy długości fali 230 nm. W przypadku czystych próbek stosunek A_{260}/A_{230} powinien wynosić około 2,2.



Rys. 18. Przykładowe widmo UV-Vis ilustrujące efekt hipochromowy dla ssDNA względem dsDNA.

Do oznaczania DNA mogą być również przydatne metody spektroskopii emisyjnej. Jednakże biomolekuła DNA nie wykazuje mierzalnej fluorescencji wewnętrznej z wyjątkiem bardzo niskich temperatur. Dlatego DNA można oznaczyć pośrednio stosując fluorescencyjne znaczniki wiążące się z podwójną helisą na drodze interkalacji. Są to różnego typu barwniki akrydynowe oraz najbardziej popularny bromek etydyny (EtBr). Mimo, iż jest to metoda pośrednia, jest ona bardziej selektywna od prostego pomiaru absorpcji przy 260 nm. Związane jest to z faktem, że w metodzie absorpcyjnej nie można wykluczyć wpływu innych czynników (wolne nukleotydy, ssDNA i białka) na mierzoną wartość absorbancji. Metoda fluorescencyjna posiada również większą czułość w porównaniu do absorpcyjnej i pozwala na oznaczenie dużo niższych stężeń kwasów nukleinowych

CZEŚĆ EKSPERYMENTALNA

6. Aparatura i odczynniki

6.1. Aparatura

W pracy badawczej do badań fizykochemicznych wykorzystano różne rodzaje technik takich jak techniki: elektrochemiczne, spektroskopowe oraz obrazowania mikroskopowego.

Wszystkie techniki wraz z informacjami o sprzęcie zostały umieszczone w tabeli 1.

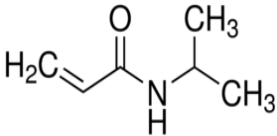
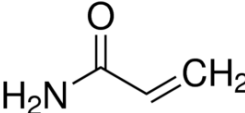
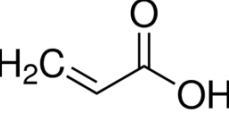
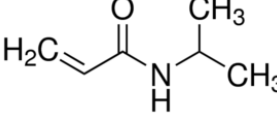
Techniki pomiarowe		Sprzęt/ Producent/ Podstawowe informacje o konfiguracji
Techniki elektrochemiczne	Woltamperometria cykliczna (CV)	Potencjostat Ivium Technologies Eindhoven Potencjostat Eco Chemie Autolab
	Woltamperometria fali prostokątnej, (SWV)	Badania prowadzone w układzie trójelektrodowym: elektrodą pracującą była elektroda z węgla szklanego (GC) elektrodą odniesienia była elektroda Ag/AgCl, natomiast elektrodą pomocniczą była elektroda platynowa
	Elektrochemiczna spektroskopia impedancyjna (EIS)	Wszystkie eksperymenty prowadzone były w puszce Faradaya w celu eliminacji zakłóceń i szumów.
Techniki spektroskopowe	Spektroskopia UV-Vis	Spektrofotometr UV-Vis Evolution 60, Waltham, MA, USA Pomiary prowadzone w 1cm kuwetach kwarcowych oraz jednorazowych kuwetach akrylowych.
	Spektroskopia korelacji fotonów, (dynamiczne rozpraszanie światła-DLS)	Zetasizer Nano Malvern zaopatrzony w laser He-Ne o mocy 4 mW i długości fali 632,8 nm
	Spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera (FTIR)	Spektrometr IR Shimadzu FTIR 8400S, Kyoto Do przygotowania próbek w postaci pastylek wraz ze sproszkowanym KBr użyto prasy hydraulicznej o ciśnieniu 10 ton /cm ²
	Spektroskopia mas z plazmą indukcyjnie sprzężoną (ICPMS)	Perkin Elmer SCIEX W badaniu użyto certyfikowanego materiału odniesienia CRM BCR-273.
Techniki obrazowania mikroskopowego	Skaningowa mikroskopia elektronowa (SEM)	Mikroskop FE-SEM MERLIN z analizatorem EDS Röntec, model M1, Zeiss

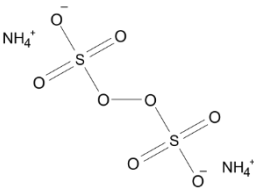
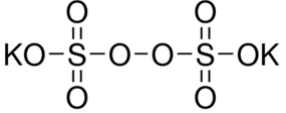
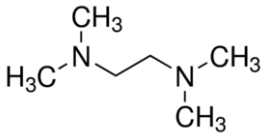
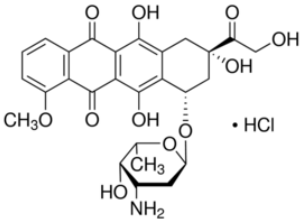
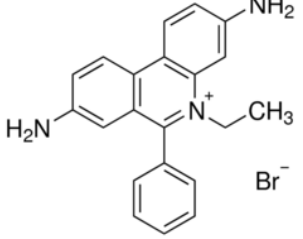
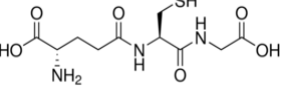
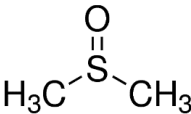
	Transmisyjna mikroskopia elektronowa (TEM)	120-kV Libra Plus TEM, Zeiss
Techniki oczyszczania	Dializa nanozeli	Spectra/Por® 7 Dialysis Membrane, MWCO 10000 Da
	Odwirowanie	Wirówka EBA 200, Hettich Zentrifugen
Inne techniki	pH, przewodnictwo elektryczne	Przyrząd wielofunkcyjny Mettler Toledo
	Skaningowa kalorymetria różnicowa (DSC)	DSC Q20 instrument TA Instruments- Waterls LLC, szybkość skanowania 1°/min

Tabela 1. Rodzaje technik oraz sprzęt wykorzystany w pracy eksperymentalnej.

6.2. Odczynniki

Odczynniki chemiczne stosowane w pracy eksperymentalnej wraz z ich krótką charakterystyką zostały umieszczone w tabeli 2.

Odczynnik	Wzór chemiczny	Producent	Funkcja
N-izopropioloakrylamid (NIPA) 97%		Sigma Aldrich	Monomer główny
Akrylamid 99%		Sigma Aldrich	Monomer główny
Kwas akrylowy 99% (AAc)		Sigma Aldrich	Monomer modyfikujący
N'N'-metylenobisakrylamid (BIS)		Sigma Aldrich	Związek sieciujący

Nadtlenosiarczan amonu (APS) 98%		Sigma Aldrich	Inicjator reakcji polimeryzacji
Nadtlenosiarczan potasu (KPS) 99%		Sigma Aldrich	Inicjator reakcji polimeryzacji
N,N,N',N'- tetrametyloetyleno- diamina (TEMED) 99%		Sigma Aldrich	Akcelerator polimeryzacji wolnorodnikowej
Chlorowodorek doksorubicyny (Dox)		LC Laboratories	Lek przeciwnowotwo- rowy, interkalator
Bromek etydyny (EtBr) 95%		Sigma Aldrich	Barwnik interkalator
Zredukowany glutation (GSH) 98%		Sigma Aldrich	Reduktor mostków disarczkowych
Dimetylosulfotlenek (DMSO) cz.d.a		POCh	Rozpuszczalnik dla Doksorubicyny

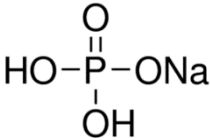
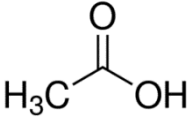
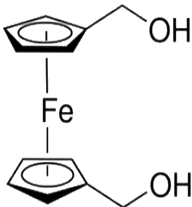
Diwodorofosforan(V) sodu NaH_2PO_4		POCh	Składnik buforu fosforanowego
Kwas octowy 99,5%		CHEMPUR	Składnik buforu octanowego
Wodorotlenek sodu (NaOH) cz.d.a	NaOH	POCh	Składnik buforu, modyfikator pH
Chlorek sodu (NaCl) cz.d.a	NaCl	POCh	Zmiana siły jonowej buforu
Chlorek potasu (KCl) cz.d.a	KCl	POCh	Zmiana siły jonowej buforu
Ferrocenodimetanol, $\text{Fc}(\text{MeOH})_2$		Sigma Aldrich	Próbnik redox
Heksacyjanożelazian(II) i (III) potasu 99%	$\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$	Sigma - Aldrich	Para próbników redox

Tabela 2. Wykaz odczynników chemicznych stosowanych w pracy eksperymentalnej.

Sekwencje oligonukleotydów oraz ich podstawowe właściwości zostały umieszczone w tabeli 3.

Nazwa użyta w pracy	Sekwencja/rodzaj oligonukleotydu	Producent	T topnienia	Zawartość par GC%
dsDNA natywne	Podwójna nić dsDNA <i>Calf Tymus</i> (dsDNA, ctDNA)	Fluka	68.5 °C	48.2
Oligo1	5'-Acrydite-GGGGG- GCTCTTGGA ACT-3'	IDT	57.3 °C	64.7

Oligo 2	5'-Acrydite GGGGG- TGAGTAGACACT-3'	IDT	53.0 °C	58.8
Oligo 3	5'ACTCATCTGTGACGAGAAC CTTGA 3'	FRIZ BIOCHEM	56.0 °C.	46.0
Oligo 4	5'PEG2000- GGGGGGCTCTTGGA CT-3'	FRIZ BIOCHEM	57.6 °C.	64.7
Oligo5	5'AGTTCCAA-SS- GAGCCCCCCC3'	IDT	57.3 °C.	64.7

Tabela 3. *Sekwencja/ typ i podstawowe właściwości oligonukleotydów użytych w pracy eksperymentalnej.*

W badaniach zastosowano 0,1M bufony fosforanowe o pH 7,4 i 5,5 oraz bufor octanowy o pH 5 jak i również bufony Brittona-Robinsona o szerokim zakresie pH (3 - 8). Do sporządzania wszystkich roztworów użyto wody demineralizowanej za pomocą systemu Milli-Q Plus/Millipore, posiadającej przewodnictwo właściwe $0,055 \mu\text{S cm}^{-1}$. Odczynniki użyte w badaniach nie były poddawane żadnym modyfikacjom z wyjątkiem monomeru NIPA, który był dwukrotnie rekrytalizowany w mieszaninie benzen/heksen (9 : 1) w celu usunięcia zanieczyszczeń i inhibitorów polimeryzacji.

7. Techniki Badawcze

7.1. Spektroskopia UV-Vis

Spektroskopia UV-Vis jest techniką, w której wykorzystuje się promieniowanie z zakresu ultrafioletu (200 – 380 nm) oraz światła widzialnego (380 – 780 nm). Technika ta jest oparta na zjawisku absorpcji promieniowania elektromagnetycznego przez materię. Zjawisku temu ulegają barwne związki organiczne posiadające w swojej strukturze grupy chromoforowe, czyli sprzężone układy wiązań podwójnych (np.: grupa nitrowa $-\text{NO}_2$, ketonowa $>\text{C}=\text{O}$)

Zasadą pomiarową w technice UV-Vis, tak jak w większości metod spektroskopowych, jest osłabienie natężenia wiązki promieniowania padającego (I_0) do wartości (I) podczas przechodzenia przez badaną próbkę. Dlatego też wyznaczono parametr zwany transmitancją, który określa stosunek natężenia wiązki promieniowania po przejściu przez próbkę do początkowego natężenia wiązki promieniowania. Parametr ten wskazuje na przepuszczalność ośrodka i wyrażany jest wzorem [244]:

$$T = \frac{I}{I_0} \quad (2)$$

gdzie:

T – transmitancja,

I_0 – natężenie wiązki promieniowania padającego na próbkę;

I – natężenie wiązki promieniowania po przejściu przez próbkę.

Kolejnym ważnym parametrem w analizie widm UV-Vis jest absorbancja, która określona jest wzorem poniżej:

$$A = \log \frac{1}{T} \quad (3)$$

gdzie:

A - absorbancja

T - transmitancja

Pomiary wykonywane za pomocą spektroskopii UV-Vis opierają głównie na się na dwóch prawach, tj: prawie Lambert’a Beer’a oraz na prawie addytywności absorbancji. Pierwsze z nich mówi, że absorbancja jest wprost proporcjonalna do molowego współczynnika absorpcji ϵ , stężenia c badanego roztworu oraz grubości warstwy absorbującej l , przez którą przechodzi wiązka promieniowania elektromagnetycznego. Zależność ta opisana jest poniższym wzorem:

$$A = \log \frac{I_0}{I} = \epsilon c l \quad (4)$$

gdzie:

A – absorbancja;

I_0 – natężenie wiązki promieniowania padającego;

I – natężenie wiązki po przejściu przez ośrodek absorbujący;

ϵ – molowy współczynniki absorpcji [$\text{dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$];

c – stężenie roztworu [mol/dm^3];

l – grubość warstwy absorbującej, [cm].

Natomiast w przypadku roztworów wieloskładnikowych stosuje się drugie prawo tj. prawo addytywności absorbancji. Prawo to zakłada, że, poszczególne składniki badanej mieszaniny nie oddziałują ze sobą, a całkowita absorbancja takiej mieszaniny jest sumą absorbancji poszczególnych składników, co opisuje poniższe wyrażenie:

$$A_c = A_1 + A_2 + \dots + A_n = l (\epsilon_1 c_1 + \epsilon_2 c_2 + \dots + \epsilon_n c_n) \quad (5)$$

gdzie:

A_c – całkowita absorbancja;

A_1, A_2 – absorbancje kolejnych składników mieszaniny,

$\varepsilon_1, \varepsilon_2$ – molowe współczynniki absorpcji składników mieszaniny,

c_1, c_2 – stężenia składników mieszaniny,

l – grubość warstwy absorbującej (drogi optycznej) [cm].

7.2. Spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera (FTIR)

Spektroskopia w podczerwieni jest techniką polegającą na badaniu absorpcji promieniowania podczerwonego przez cząsteczki związków chemicznych. Podczerwień obejmuje zakres promieniowania elektromagnetycznego o długości fali od 780 nm do 1 mm. Jednak szczególnie użyteczny jest obszar środkowej podczerwieni od 2,5 μm do 25 μm , co odpowiada liczbie falowej od 4000 cm^{-1} do 400 cm^{-1} .

Spektroskopia w podczerwieni wykorzystuje fakt, że wszystkie cząsteczki związków chemicznych wirują/rotują wokół własnej osi, natomiast ich atomy oscylują względem siebie. Absorbcja określonej dawki promieniowania podczerwonego powoduje osiągnięcie konkretnego stanu wzbudzenia, co skutkuje zamianami w energii oscylacyjnej i rotacyjnej wybranej molekuly.

Szczególnie ważną rolę ze względu na większą energię mają wzbudzenia oscylacyjne. Możemy je podzielić na:

- rozciągające (walencyjne ν), symetryczne lub asymetryczne,
- deformacyjne (δ), np. skręcające, nożycowe i kołyszące.

Nie wszystkie przejścia na wyższy poziom oscylacyjny są dozwolone. Przejścia dozwolone w spektroskopii IR muszą spełniać odpowiednie kryteria. W podczerwieni aktywne są jedynie przejścia cząsteczek będących dipolami. Warunkiem absorpcji promieniowania (możliwości wzbudzenia drgania przez promieniowanie) jest zmienność momentu dipolowego cząsteczki w trakcie tego drgania. Określone grupy funkcyjne związków organicznych charakteryzują się ściśle określonym zakresem absorpcji promieniowania podczerwonego. Częstotliwość, przy której dana grupa funkcyjna absorbuje promieniowanie IR, nazywa się częstotliwością grupy, a takie drganie grupy funkcyjnej – drganiem charakterystycznym.

Liczba drgań w cząsteczce jest ściśle związana z liczbą stopni swobody cząsteczki i jest równa sumie stopni swobody tworzących ją atomów. Każdy atom posiada trzy stopnie swobody ruchu zgodnie ze współrzędnymi kartezjańskimi. W związku z tym cząsteczka składająca się z N atomów ma $3N$ stopni swobody. Stopnie swobody składają się z ruchów translacyjnych, ruchu obrotowego oraz ruchów oscylacyjnych i rotacyjnych. Stopnie swobody dotyczące ruchów oscylacyjnych i rotacyjnych a zatem liczby drgań normalnych wynoszą:

- a) $3N-6$ - dla cząsteczek nieliniowych

b) $3N-5$ dla cząsteczek liniowych,
gdzie: N to liczba atomów w cząsteczce.

Mała przezroczystość materiałów w zakresie średniej podczerwieni wymaga odpowiedniego przygotowania próbek do analizy metodą IR. Pomiary dla gazów i cieczy wykonuje się przy użyciu kuwet z okienkami z materiałów przenikalnych dla podczerwieni np. z KBr. Natomiast widma ciał stałych uzyskuje się tworząc pastylki z użyciem odpowiednich halogenków litowców (najczęściej KBr) lub stosując płytki krzemowe.

Widma IR są wykresami zależności absorpcji promieniowania od liczby falowej. Pełna interpretacja widm w podczerwieni jest niezwykle trudna ze względu na nakładające się pasma drgań deformacyjnych i rozciągających w obrębie jednej cząsteczki. W praktyce konkretne grupy funkcyjne np. C=O, N-H, -OH dają charakterystyczne pasma na widmie niezależnie od struktury cząsteczki i dzięki temu mogą być zidentyfikowane.

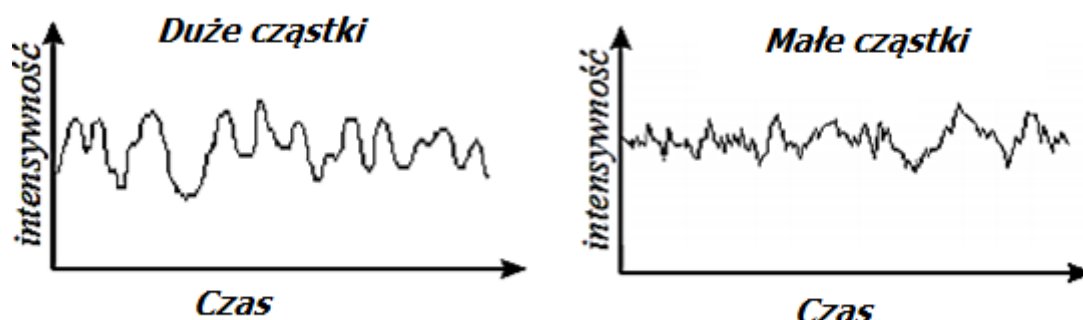
We współczesnych spektrofotometrach FTIR stosuje się metodę polegającą na jednoczesnym oświetlaniu próbki wiązką światła z całego zakresu światła podczerwonego. Po absorpcji promieniowania przez próbkę doprowadza się do interferencji z wiązką z tego samego źródła, która nie przeszła przezbadaną próbkę. W wyniku, czego otrzymuje się widmo interferencyjne, które jest przekształcane przez oprogramowanie z zastosowaniem operacji matematycznej zwanej transformacją Fouriera. Dzięki tego typu przekształceniom otrzymujemy widma o wyższej rozdzielczości i wyższym stosunku sygnału do szumu.

7.3. Dynamiczne rozpraszanie światła (DLS)

Dynamiczne rozpraszanie światła (ang. *Dynamic Light Scattering* – DLS) zwane również spektroskopią korelacji fotonów (ang. *Photon Correlation Spectroscopy* – PCS) jest metodą pozwalającą na pomiar wielkości cząstek o rozmiarach poniżej $1\mu\text{m}$ oraz ich dystrybucji w fazie ciekłej. Wielkością, jaką uzyskujemy tą metodą jest średnica/promień hydrodynamiczny, który odpowiada średnicy/promieniowi sztywnej kuli dyfundującej w taki sam sposób jak mierzone indywiduum. Cząstki w roztworach są solwatowane przez cząsteczki wody, co sprawia, że ich średnica dynamiczna mierzona tą metodą będzie nieco większa niż ich rozmiar w stanie suchym lub gazowym. DLS wykorzystuje różnicę w szybkości poruszania się molekuł (ruchy Browna) w roztworze, która jest skutkiem różnicy ich rozmiarów. Światło lasera ulega rozproszeniu na cząstkach wykonujących ruchy Browna, a do detektora trafia sygnał, który zależy od szybkości poruszania się cząstek.

W związku z tym, że cząsteczki są w ciągłym ruchu, otrzymany wykres intensywności światła rozproszonego ulega fluktuacjom w czasie. Na podstawie tego wykresu można

wnioskować o rozmiarze analizowanych cząstek. Dla dużych cząstek sygnał zmienia się wolniej a dla mniejszych szybciej, jednak w obu przypadkach są to bardzo szybkie procesy.



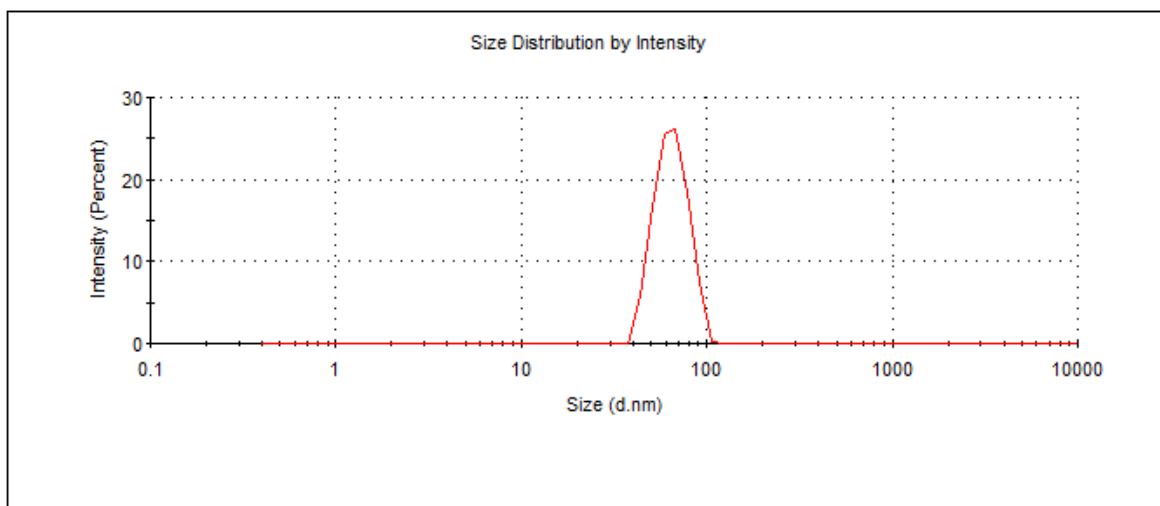
Rys. 19. Fluktuacje światła rozproszonego w zależności od wielkości analizowanych cząstek.

Zarejestrowane przez detektor zmiany intensywności światła rozproszonego ulegają przekształceniu przy wykorzystaniu równania Stokesa-Einstaina i oblicza się promień hydrodynamiczny, R_h , analizowanych cząstek

$$R_h = \frac{kT}{6\pi\eta D} \quad (6)$$

gdzie: D – współczynnik dyfuzji, k – stała Boltzmanna, T – temperatura oraz η – lepkość rozpuszczalnika.

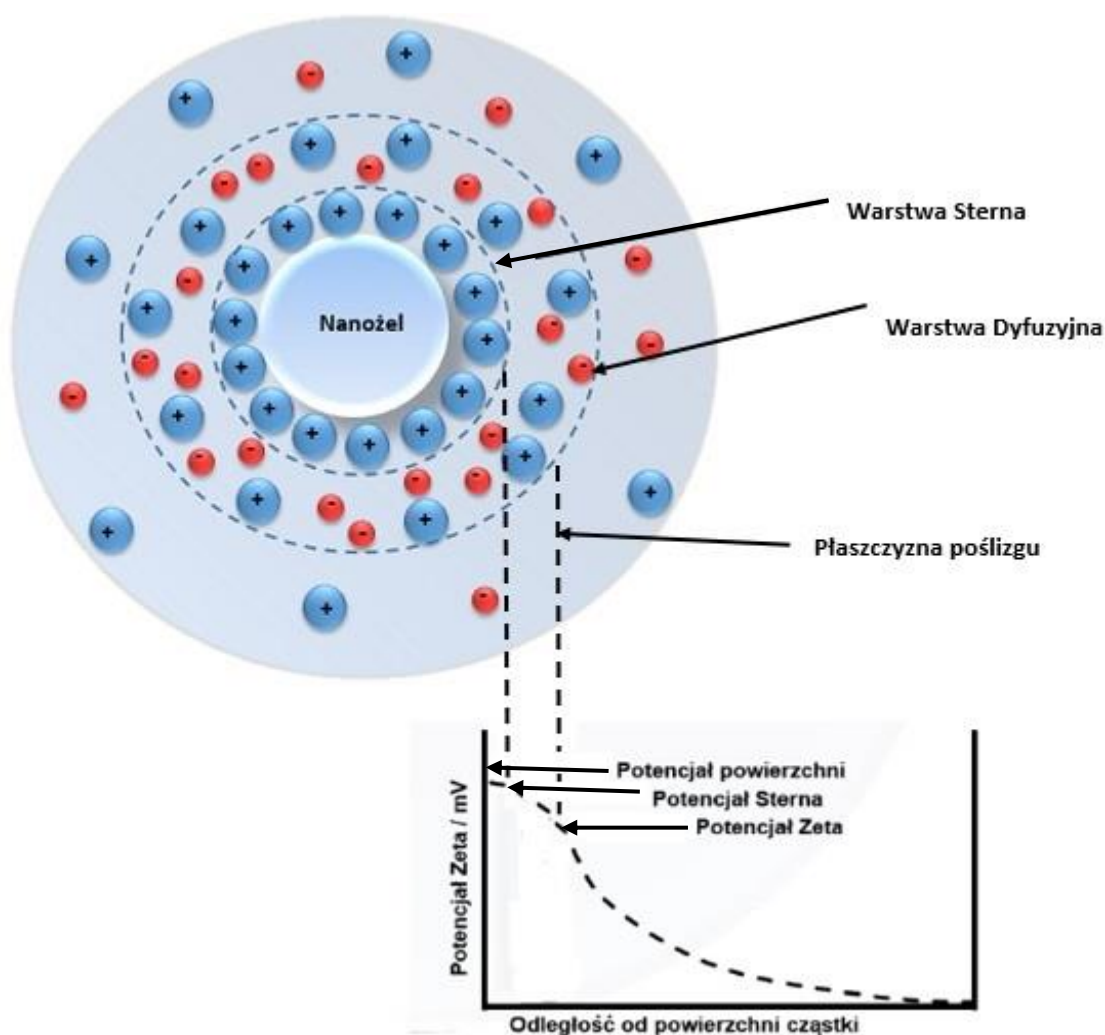
Pełna analiza prowadzi do otrzymania rozkładu wielkości cząstek, tj. procentowego udziału poszczególnych rozmiarów. Podstawowy wykres rozkładu dotyczy intensywności światła rozproszonego (ang. *size by intensity*), jednak w wyniku odpowiednich przekształceń można uzyskać wykres uwzględniający objętości fazy rozpraszanej (ang. *size by volume*) lub liczbę cząstek rozpraszanych (ang. *size by number*).



Rys. 20. Przykładowy wykres rozkładu rozmiaru cząstek.

Korzystając ze spektrometru DLS można również wyznaczyć parametr istotny przy ustalaniu stabilności roztworów koloidalnych; parametrem tym jest potencjał zeta (ζ). Potencjał zeta, czyli potencjał elektrokinetyczny powstaje na granicy tzw. płaszczyzny poślizgu, która występuje między warstwą cieczy otaczającej cząstkę (warstwa Sterna) a warstwą dyfuzyjną. Warstwę Sterna tworzą jony ściśle ją otaczające o ładunku przeciwnym do ładunku cząstki. Z kolei warstwa dyfuzyjna jest mieszaniną jonów zarówno dodatnich jak i ujemnych, luźno związanych z powierzchnią analizowanej cząstki. Rozkład jonów w podwójnej warstwie elektrycznej nanożelu został przedstawiony na rysunku 21.

Potencjał zeta wyznacza się za pomocą technik elektroforetycznych mierzących poruszające się cząstki pod wpływem działania zewnętrznego pola elektrycznego. Cząstki w obrębie płaszczyzny poślizgu poruszają się wraz z nią, natomiast jony spoza granicy już nie. Wskutek czego potencjał ζ będzie to potencjał będący tuż poza tą warstwą. Wartości potencjału zeta są mniejsze od wartości potencjału powierzchniowego ze względu na większą odległość od powierzchni nanocząstki. W badaniu potencjału zeta zwykle wykorzystuje się różnicę częstotliwości fal: wysyłanej i rejestrowanej (tzw. laserowy efekt Dopplera podczas elektroforezy – LDE). Inną metodą jest badanie elektroforetycznego rozproszenia światła (ELS), gdzie analizowana jest prędkość poruszania się cząstek pod wpływem przyłożonego napięcia elektrycznego.



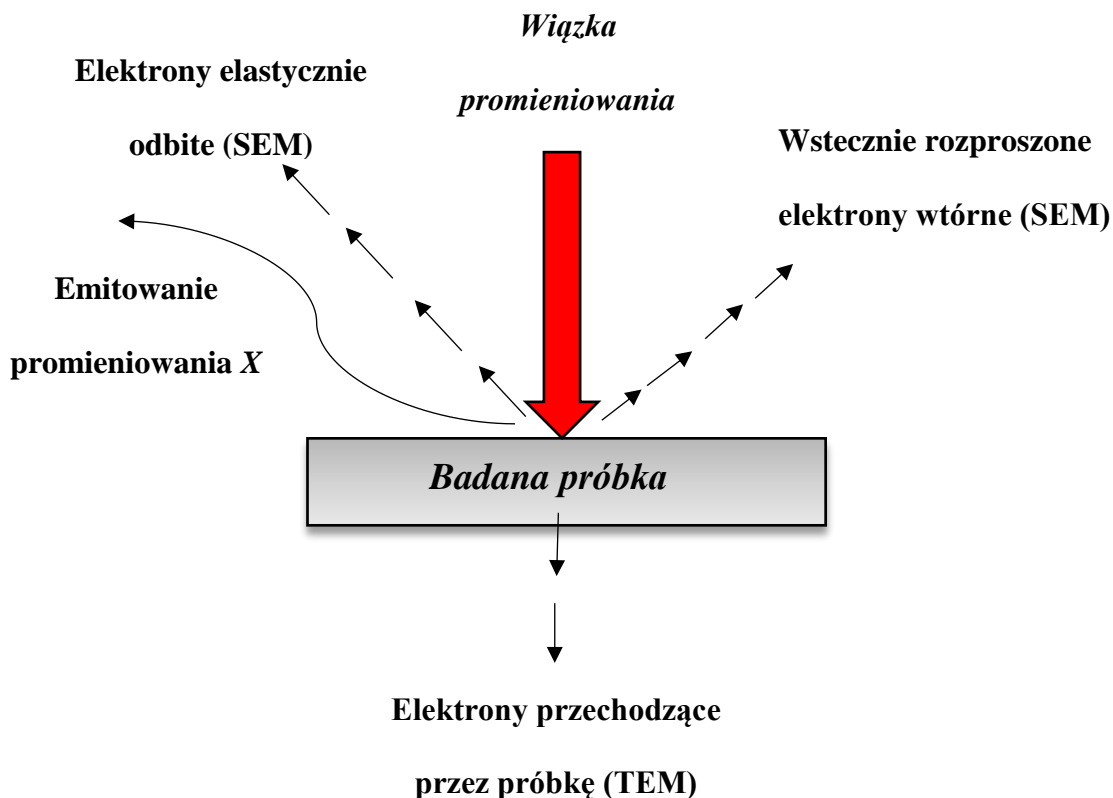
Rys 21. *Płaszczyzny istotne w pomiarze potencjału zeta nanocząstek.*

Przyjęto, że mieszanina koloidalna jest stabilna wtedy, gdy jej potencjał ζ przekroczy wartość 30 mV [245]. Znaczny wpływ na wartości potencjału zeta ma pH badanego roztworu. Wpływ ten jest różny dla różnych substancji.

7.4. Mikroskopia elektronowa

Mikroskopia elektronowa jest metodą obrazowania polegającą na bombardowaniu analizowanej próbki wiązką elektronową. W wyniku oddziaływań z materiałem próbki generowane są różne rodzaje sygnałów (elektrony, fotony, promieniowanie rentgenowskie), które mogą być użyte do obrazowania bądź charakteryzowania próbki. W mikroskopie elektronowym powiększenie jest takie duże, że możliwe jest obrazowanie próbek niewidocznych w zwykłym mikroskopie świetlnym. Mikroskopy elektronowe uzyskują

rozdzielczość nawet do 0,05 nm. Parametry nowych mikroskopów elektronowych poprawiają się z roku na rok. Wyróżniamy dwa typy mikroskopii elektronowej: transmisyjną, gdzie wiązka elektronów przechodzi przez badaną próbkę, i skaningową, gdzie wiązka skanuje powierzchniowo próbkę.



Rys. 22. Rodzaje mikroskopii elektronowej. Różne oddziaływania wiązki elektronów z próbką.

7.4.1. Transmisyjna

Transmisyjna mikroskopia elektronowa (TEM) jest metodą obrazowania struktury próbki za pomocą wiązki elektronów emitowanych z katody. Elektrony są przyspieszane dzięki różnicy potencjałów między katodą i anodą. Po uzyskaniu odpowiedniej energii są w stanie przejść przez odpowiednio przygotowaną cienką warstwę próbki. Źródłem elektronów w tego typu mikroskopii jest najczęściej włókno wolframowe bądź kryształ LaB₆. Średnica wiązki elektronowej padającej na analizowaną próbkę jest bezpośrednio skorelowana z wartością powiększenia oraz rozdzielczością obrazu. Po wnikięciu do próbki, elektrony oddziałują z jej atomami ulegając ugięciu jak i również rozproszeniu. W końcu elektrony, które przejdą przez badany obiekt ulegają skupieniu przez obiektyw z utworzeniem dwuwymiarowego powiększonego obrazu. Duże znaczenie ma wykorzystanie efektu dyfrakcyjnego.

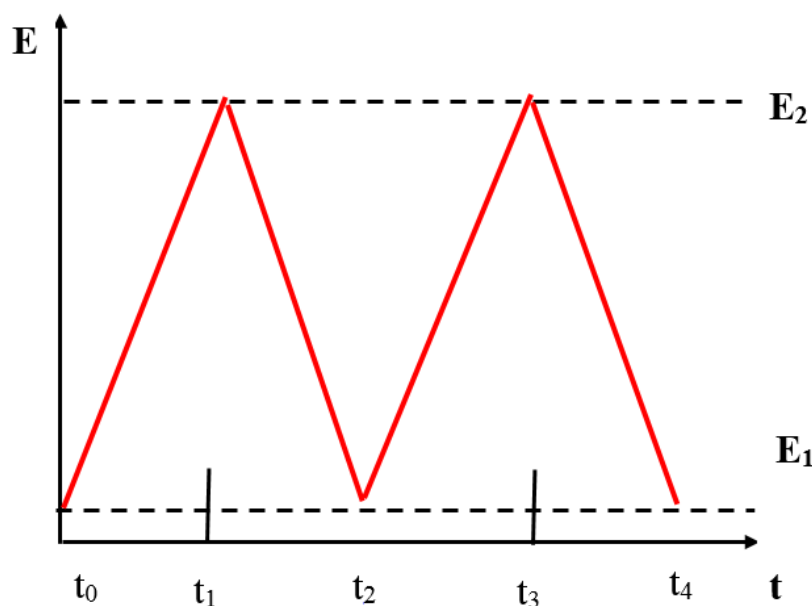
7.4.2. Skaningowa

Skaningowa mikroskopia elektronowa (SEM) pozwala na badanie powierzchni badanych materiałów. Metoda ta polega na skanowaniu powierzchni próbki zogniskowaną wiązką elektronów powstałą w kolumnie mikroskopu. Wiązka elektronów emitowana przez katodę przyspieszana jest w polu elektrycznym, skupiana jest na soczewkach i ukierunkowana na cewkach. Maksymalne napięcie między katodą i anodą wynosi 300 kV. Jednak przy pracy z delikatnymi próbkami biologicznymi można stosować jedynie 60 – 120 kV. Odpowiedni detektor zbiera emitowane sygnały punkt po punkcie dając powiększony obraz obiektu. Intensywność obrazu zależy od rodzaju wybranego detektora. Do tworzenia obrazu wykorzystywane są sygnały powstałe w wyniku oddziaływania wiązki pierwotnej z badanym obiektem. Do tego typu sygnałów zaliczamy: elektrony elastycznie odbite (ang. *backscattered electrons*, BSE), elektrony wtórne (ang. *secondary electrons*, SE) i promieniowanie rentgenowskie. Najlepszą rozdzielczość możemy uzyskać analizując sygnał elektronów wtórnych. Są one niezwykle przydane w określaniu topografii próbki. Związane jest to z tym, że większa część elektronów wtórnych to te, które opuszczają wypukłe miejsca na powierzchni próbki, podczas gdy tylko niewielka ich ilość pochodzi z zagłębień, co poprawia kontrast topograficzny. Pewne informacje chemiczne o obiekcie uzyskujemy za pomocą elektronów odbitych (BSE), gdyż zdolność odbijania elektronów jest wprost proporcjonalna do kwadratu liczby atomowej. Strukturę obiektu można scharakteryzować za pomocą wiązki ulegającej ugięciu i wykorzystaniu dyfrakcji elektronów (EBSD). Natomiast informację o składzie chemicznym próbki uzyskamy stosując detektor promieniowania rentgenowskiego.

Obrazy powstałe przy użyciu mikroskopu skaningowego są porównywane do obrazów widzianych ludzkim okiem, jednak nie są to obrazy rzeczywiste. Powstają one, bowiem na bazie wymuszonych sygnałów emitowanych przez materiał. Aby otrzymać obraz analizowanej powierzchni niezbędne jest ustalenie współrzędnych wiązki elektronowej oraz natężenia sygnału elektronów wtórnych lub odbitych. Tworzenie obrazu polega na odpowiednim ułożeniu plamek sygnału, które różnią się intensywnością barwy. Dla silnego sygnału otrzymujemy jasną plamkę, natomiast słaby sygnał odpowiada ciemnej plamce. W mikroskopii elektronowej stosujemy próżnię, gdyż ważne jest, aby elektrony wybite lub odbite z powierzchni analizowanej próbki nie napotkały na drodze żadnej przeszkody; zmniejszą one ostrość uzyskiwanych obrazów.

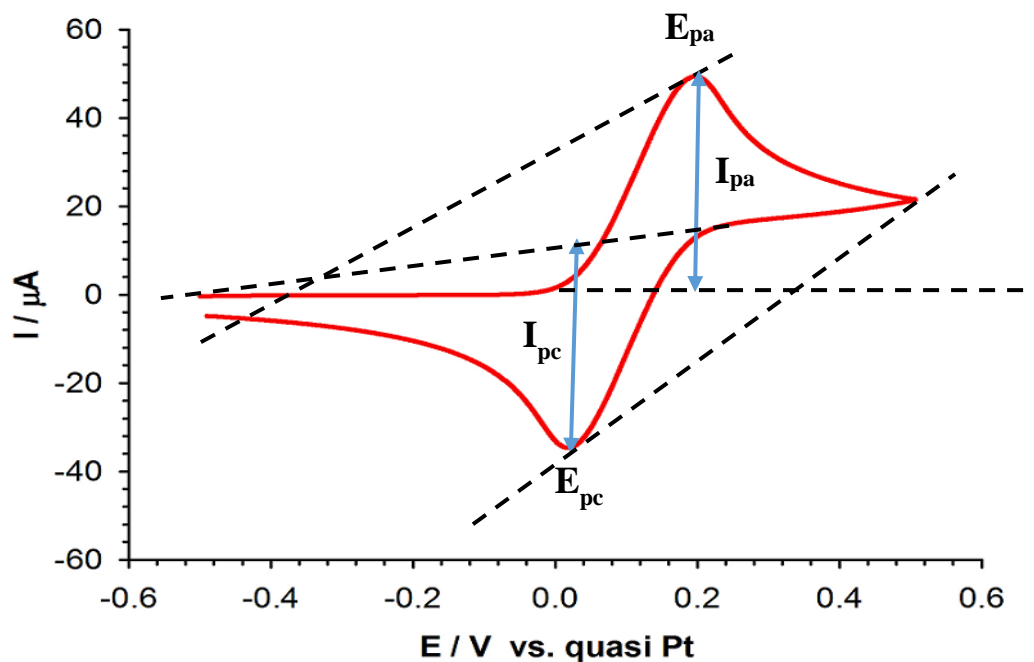
7.5. Woltamperometria cykliczna (CV)

Woltamperometria cykliczna jest to jedna z najczęściej stosowanych technik elektroanalitycznych służących do badania kinetyki i mechanizmów reakcji elektrodowych. Polega ona na pomiarze natężenia prądu płynącego przez elektrodę wskaźnikową w funkcji potencjału przykładowego do elektrody pracującej. Elektroda pracująca jest spolaryzowana potencjałem zmieniającym się liniowo od wartości E_1 do E_2 i następnie mamy powrót do potencjału początkowego E_1 (patrz rys. 23).



Rys. 23. *Zmiany potencjału elektrody pracującej w technice CV.*

Wraz ze wzrostem potencjału od wartości E_1 do E_2 następuje utlenianie substancji a na krzywej woltamperometrycznej obserwujemy pik prądu anodowego (I_{pa}). Natomiast, po odwróceniu kierunku zmian potencjału, w przypadku procesu odwracalnego, powstałe produkty utleniania ulegają redukcji, a na wykresie uzyskujemy pik prądu katodowego (I_{pc}). Na rysunku 24 przedstawiono typową krzywą CV uzyskaną dla procesu odwracalnego.



Rys. 24. Krzywa woltamperometrii cyklicznej dla procesu odwracalnego.

Różnicę pomiędzy potencjałem pików anodowego i katodowego dla reakcji w pełni odwracalnych w temp. 25 °C charakteryzuje równanie Nernsta:

$$E_{pa} - E_{pc} = \frac{0,059}{n} [V] \quad (7)$$

gdzie:

n – liczba elektronów biorących udział w procesie elektrodowym,

E_{pa} – potencjał pików anodowego,

E_{pc} – potencjał pików katodowego.

Zależność, która łączy wartość prądu pików (I_p) z szybkością zmiany potencjału określana jest za pomocą równania Randlesa – Ševčika. W warunkach dyfuzji liniowej, w temperaturze 25 °C, równanie to ma postać:

$$I_p = 2,69 \cdot 10^5 n^{3/2} A D^{1/2} \nu^{1/2} c^* \quad (8)$$

gdzie:

c^* – stężenie substancji elektroaktywnej w głębi roztworu,

D – współczynnik dyfuzji,

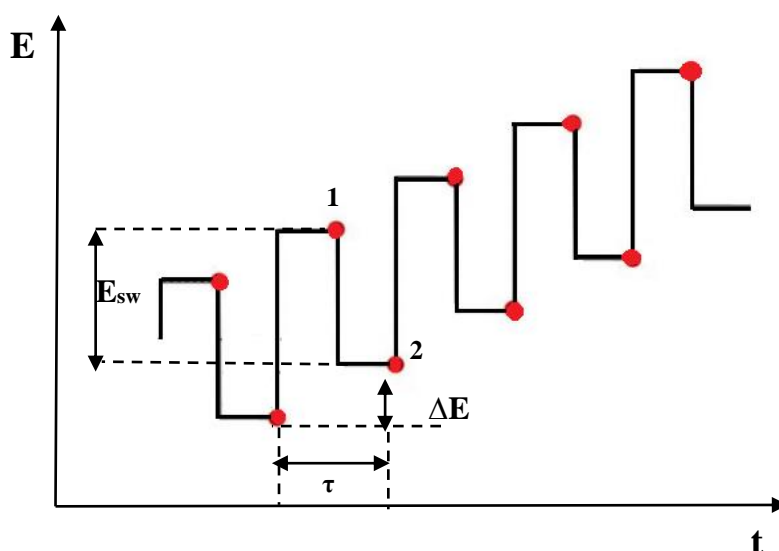
A – powierzchnia elektrody,

n – liczba przenoszonych elektronów,

ν – szybkość przemiatania potencjału.

7.6. Woltamperometria fali prostokątnej (SWV)

Woltamperometria fali prostokątnej jest to technika woltamperometryczna polegająca na nałożeniu na zmieniający się schodkowo potencjał prostokątnych impulsów. Dzięki tej metodzie można prawie całkowicie wyeliminować prąd pojemnościowy, co powoduje, że granica detekcji jest dużo mniejsza. Ze względu na to, technika ta stosowana jest często do oznaczania śladowych ilości substancji. Zmiana potencjału przy użyciu techniki SWV przedstawiona jest na rysunku 25. Pomiar prądu wykonywany jest dwukrotnie podczas każdego cyklu: na końcu pierwszego impulsu (w czasie t_1) i na końcu powrotnego impulsu (w czasie t_2). Rejestrowany sygnał jest różnicą prądów pomiędzy tymi punktami. Uzyskiwany woltamperogram SWV ma kształt piku symetrycznego względem potencjału półfali, a natężenie prądu piku jest proporcjonalne do stężenia analizowanych substancji [246].



Rys. 25. Zmiany potencjału na elektrodzie w metodzie SWV. E_{sw} to amplituda fali prostokątnej, ΔE wysokość kroku, τ okres fali prostokątnej, 1 i 2 to punkty pomiaru.

Wartość natężenia prądu piku uzyskiwanego w czasie pomiaru można uzyskać z równania [247]:

$$\Delta i_p = nFAD^{1/2}\Delta\Phi_p f^{1/2}c^* \quad (9)$$

gdzie:

wartość Φ_p zależy od n , E_{sw} i ΔE i określa się ją jako bezwymiarową wartość różnicy prądów w maksimum, f – to częstotliwość fali SW.

Praktycznie w przyrządach pomiarowych prąd nie jest próbkowany punktowo, a jest całkowany w pewnym przedziale czasowym i jego średnia wartość jest wysyłana do rejestratora. To nieco komplikuje analizę fizykochemiczną układów.

7.7. Elektrochemiczna spektroskopia impedancyjna (EIS)

Elektrochemiczna spektroskopia impedancyjna (ang. – *Electrochemical Impedance Spectroscopy*) jest szeroko używaną metodą do charakteryzacji materiałów elektroaktywnych. Pozwala ona na określenie szybkości reakcji elektrodowych jak również innych parametrów, włączając pośrednie określenie struktury powierzchni elektrody. Metoda ta polega na pomiarze impedancji pomiędzy elektrodą pracującą a pomocniczą w szerokim zakresie częstotliwości (1 mHz - 100 MHz). Podstawową zaletą tej techniki pomiarowej jest możliwość rozdzielania procesu przeniesienia elektronu od procesów dyfuzji oraz przewodnictwa elektrolitu podstawowego.

W praktyce wykonując pomiary EIS naruszamy stan równowagi układu przez nakładanie zmiennoprądowych impulsów elektrycznych o zadanej amplitudzie i częstotliwości. Otrzymujemy odpowiedź prądową przesuniętą w fazie względem początkowej wartości sygnału prądowego. Korzystając z przesunięcia fazowego między sygnałem początkowym a uzyskanym w pomiarze oraz z modułu impedancji Z można dla danej częstotliwości fali zmiennoprądowej nanieść punkt na płaszczyznę $\text{Re}(Z) - \text{Im}(Z)$, czyli nanieść rzeczywistą i urojoną część impedancji.

Jeśli w celu zaburzenia próbki przykładamy zmiennoprądowy sygnał o małej amplitudzie możemy skorzystać ze wzoru:

$$E(t) = E_0 \cos(\omega t) \quad (10)$$

gdzie:

$E(t)$ – potencjał w czasie t ,

t – czas;

E_0 – amplituda sygnału,

ω – częstotliwość kołowa.

Otrzymujemy odpowiednią odpowiedź prądową zgodną ze wzorem:

$$I(t) = I_0 \cos(\omega t + \varphi) \quad (11)$$

gdzie:

$I(t)$ – natężenie prądu w czasie t ,

I_0 – amplituda sygnału,

φ – przesunięcie fazowe.

Z tego wynika, że impedancja takiego układu wyrażona jest wzorem:

$$Z = \frac{E(t)}{I(t)} = Z_0 \frac{\cos(\omega t)}{\cos(\omega t + \varphi)} \quad (12)$$

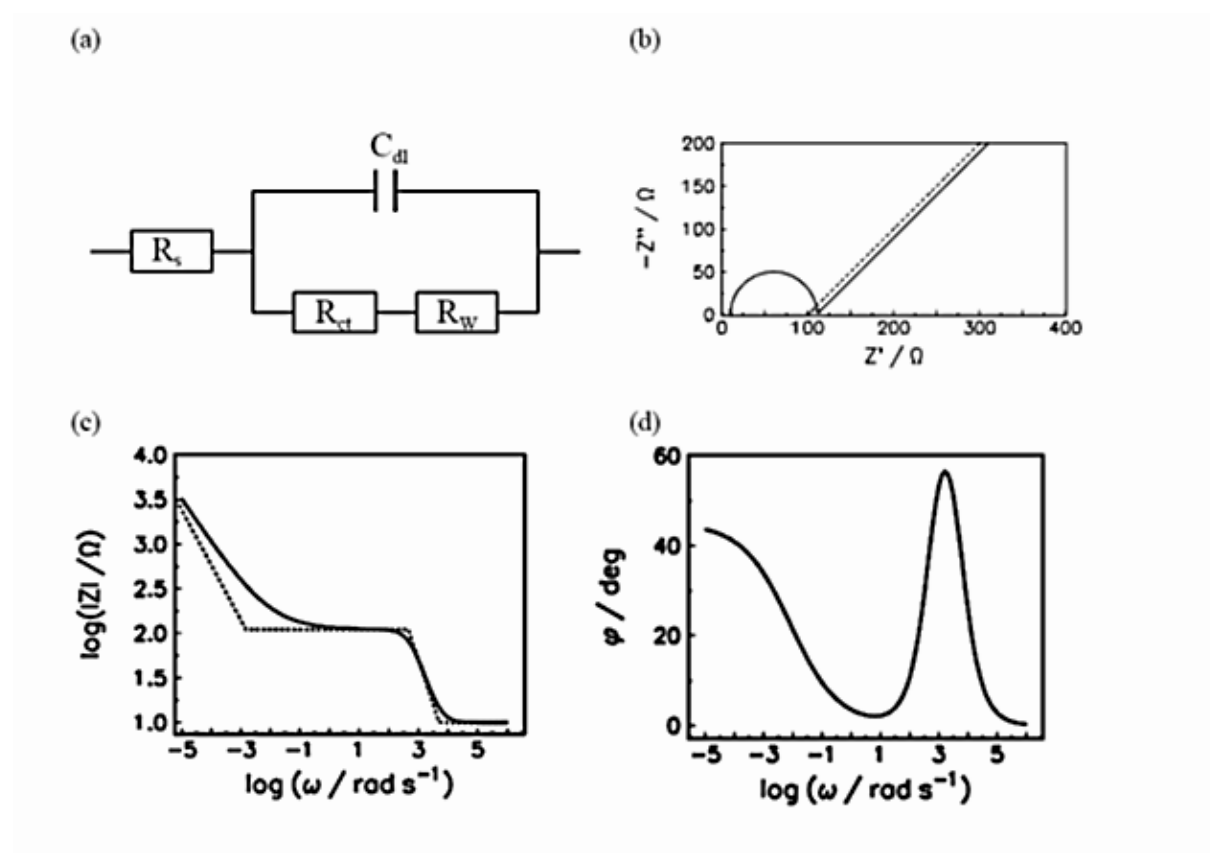
gdzie:

Z – impedancja;

Z_0 – moduł impedancji;

φ – kąt przesunięcia fazowego.

Wyniki impedancji przedstawione są zazwyczaj za pomocą wykresów Nyquista lub Bode'ego. Pierwszy z nich to krzywa w układzie $-\text{Im}(Z)$ vs. $\text{Re}(Z)$. Natomiast drugi wykres składa się z dwóch krzywych $\log(Z)$ vs. $\log(\omega)$ i $\log(\varphi)$ vs. $\log(\omega)$. Z wykresów Nyquista łatwo możemy odczytać naturę procesów. Rozmiar półkola na wykresie Nyquista jest miarą szybkości przeniesienia ładunku, natomiast prosta świadczy o kontroli reakcji przez proces dyfuzyjny. Jeżeli chodzi o wykresy Bode'ego dzięki nim można ustalić ilość elementów reakcji i zakres częstotliwości, przy których one zachodzą.

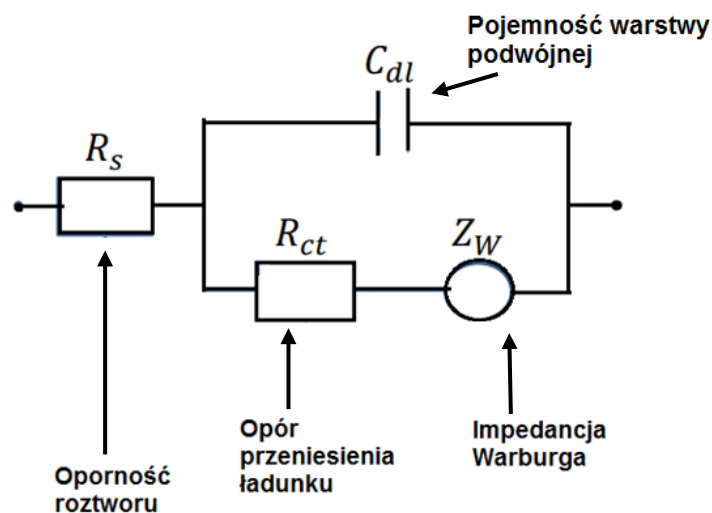


Rys. 26. Wykresy ilustrujące impedancję według (b) Nyquista i (c, d) Bodego dla półnieskończonej dyfuzji liniowej opisanej obwodem elektrycznym Randlesa umieszczonym na rysunku (a). Linia ciągła całkowita impedancja, linia przerywana impedancja faradajowska.

Większość reakcji elektrodowych daje się przedstawić w EIS jako elementy elektryczne o konkretnych stałych czasowych. Dlatego też można interpretować widma EIS za pomocą tzw. obwodów zastępczych. W obwodach zastępczych każdy proces elektrodowy przypisany jest odpowiedniemu elementowi RLC. Warstwa podwójna to kondensator, a opór przeniesienia elektronu i proces dyfuzji przedstawiane są, jako oporniki. Elementy te tworzą obwód

elektryczny. Polega to na przyporządkowaniu każdemu procesowi chemicznemu (elektrochemicznemu) elementu typu RLC (lub mu zbliżonego) o charakterystycznym parametrze. Z takich elementów tworzy się obwód elektryczny.

Przykładowo, jeżeli w wybranym reżimie czasowym reakcja jest quasi-odwracalna to szybkość przeniesienia elektronu jest zbliżona do szybkości transportu masy. Reakcja staje się kontrolowana przeniesieniem elektronu w przypadku wysokich częstotliwości a dyfuzją przy niskich częstotliwościach fali sinusoidalnej. Obwód zastępczy dla takiego procesu elektrodowego w warunkach dyfuzji liniowej, półnieskończonej został przedstawiony przez Randlesa i składa się z następujących elementów: R_s - oporności roztworu, C_{dl} - pojemności podwójnej warstwy elektrycznej, R_{ct} - impedancji faradajowskiej, R_{CT} - oporności przeniesienia elektronu i W - impedancji Warburga związanej z dyfuzją reagentów, patrz rysunek 27.



Rys. 27. Zastępczy obwód elektryczny dla quasi-odwracalnych procesów elektrodowych według Randlesa.

W przypadku całkowicie odwracalnej reakcji elektrodowej proces przeniesienia elektronu przez granicę faz jest szybszy niż transport analitu (dyfuzja). W związku z tym szybkość tej reakcji zależy od szybkości dyfuzji jako najwolniejszego etapu reakcji. W tego typu układzie opór przeniesienia ładunku może być pominięty. Obwód zastępczy składa się wtedy z szeregowego połączenia oporu R_s z równoległym obwodem złożonym z pojemności C_{dl} i z impedancji Warburga, Z_w , związanej z dyfuzyjnym transportem składników reakcji.

8. Hydrożele modyfikowane DNA w skali makro

Początki mojej pracy eksperymentalnej to synteza hydrożeli w skali makro. Syntezowałam żele na bazie akryloamidu i N-izopropylamidu. Hydrożele modyfikowałam w sposób fizyczny natywnym dsDNA oraz ssDNA otrzymanym poprzez denaturację. Badania elektrochemiczne uzyskanych matryc umożliwiły rejestrację pików guaniny i adeniny obecnych w DNA wprowadzonym do sieci hydrożelu. DNA w hydrożelu pełniło funkcję rezerwuaru leku przeciwnowotworowego: dokсорubicyny (Dox), która oddziaływała z DNA na drodze interkalacji. Do uwalniania dokсорubicyny z matryc zastosowałam temperaturę 45 °C rutynowo stosowaną w terapii hipertermicznej. Powodowała ona lokalne zmiany w strukturze DNA oraz kurczenie się matrycy polimerowej. W niniejszym rozdziale zostanie przedstawiona dokładana analiza fizykochemiczna oraz wykorzystanie tego typu matryc jako systemów uwalniania leków przeciwnowotworowych.

8.1. Hydrożele PAM/DNA

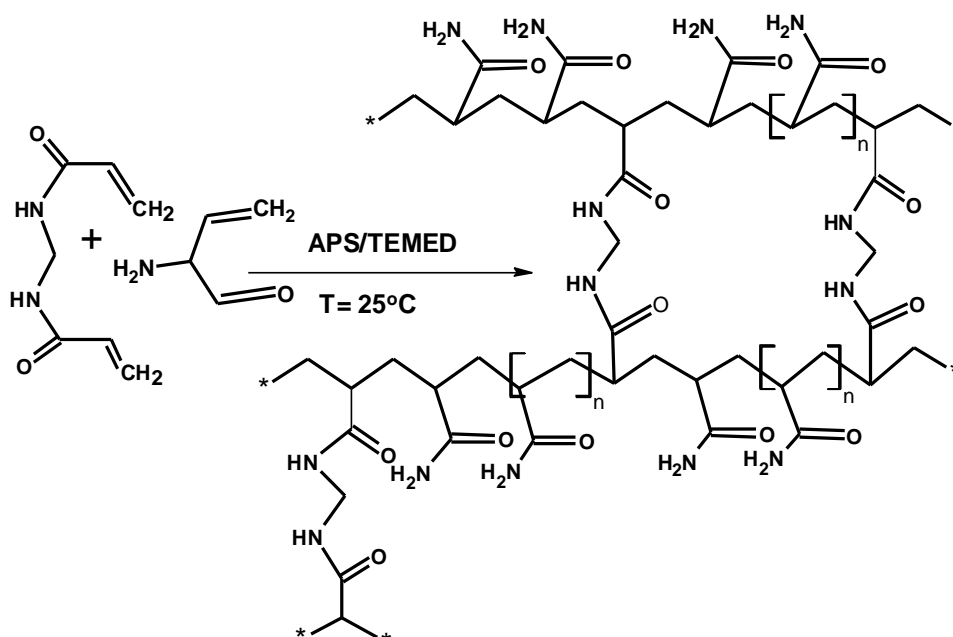
Przedmiotem moich badań były termoczule hydrożele na bazie akryloamidu fizycznie zmodyfikowane za pomocą natywnej formy DNA. Taką modyfikację prowadziłam wykorzystując oddziaływania elektrostatyczne dodatnio naładowanego szkieletu polimerowego i ujemnie naładowanych grup fosforanowych obecnych w DNA. Głównym celem syntezy było sprawdzenie wydajności fizycznej modyfikacji sieci polimerowej i analiza możliwości zastosowania powstałych w jej wyniku matryc do konstrukcji nośników substancji przeciwnowotworowych.

8.1.1. Synteza i oczyszczanie

Syntezę hydrożeli z niekowalencyjnie wprowadzonym DNA natywnym prowadziłam za pomocą polimeryzacji wolnorodnikowej. Schemat syntezy typowej sieci PAM został przedstawiony na rysunku 28. Wprowadzenie oligonukleotydów do sieci zachodziło przy wykorzystaniu oddziaływań typu fizycznego pomiędzy grupami amidowymi obecnymi w sieci a grupami fosforanowymi pochodzącymi od DNA. [248,249].

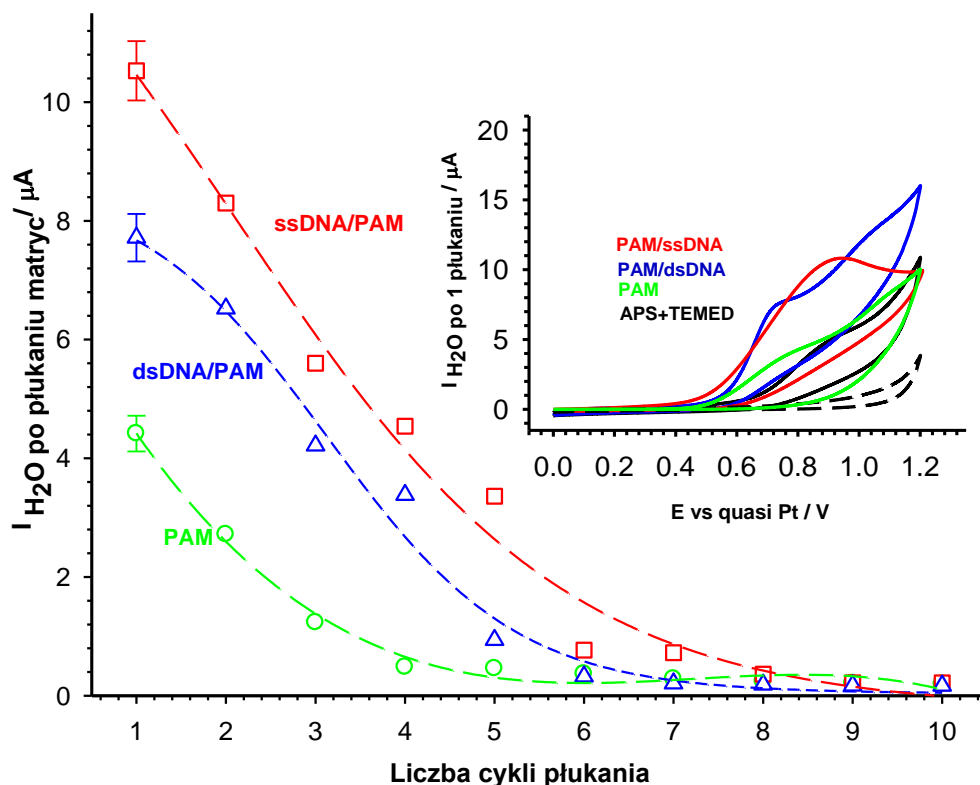
W celu przygotowania hydrożeli z niekowalencyjnie wprowadzonym DNA mieszało po 2,5 ml roztworów natywnego DNA rozpuszczonego w 0,1 M buforze fosforanowym o pH 7,4 oraz roztwory monomerów (akryloamidu i metylenobiskarylamidu). Stężenie DNA obliczano spektrofotometrycznie przy użyciu współczynnika ekstynkcji 13200 M cm⁻¹. Obydwa roztwory przed zmieszaniem odgazowano czystym argonem. Następnie dodawano inicjator reakcji APS oraz akcelerator przyspieszający reakcję - TEMED. Polimeryzacja

przewodzona była w cylindrycznych probówkach. Po polimeryzacji żele chłodzono w łaźni lodowej, a następnie w lodówce w temperaturze około 5 °C przez około 15 godzin.



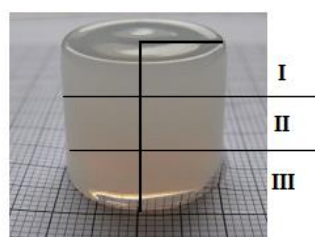
Rys. 28. Schemat syntezy sieci hydrożelowej PAM przy użyciu polimeryzacji wolnorodnikowej.

Oczyszczanie sieci polimerowej z niezwiązanych fragmentów DNA oraz pozostałości po syntezie stanowiło kolejny krok w dalszej analizie powstałych matryc. Żele przepłukiwano buforem, a po każdym płukaniu monitorowano odpowiedź anodową popłuczyn celu sprawdzenia ilości elektroaktywnych zanieczyszczeń wypłukiwanych z matryc. Zauważyłam, że piki anodowego utleniania APS i TEMED znajdowały się blisko pików pochodzących od dsDNA. Na rysunku 29 możemy zaobserwować zależność między ilością cykli płukania hydrożeli a prądem anodowego utleniania pochodzącego od zanieczyszczeń dla poszczególnych matryc. Widzimy, że prąd spada do zera między 9 a 10 płukaniem. W związku z tym założyliśmy, że 10 dwu godzinnych etapów płukania żeli wystarczyło do usunięcia wszystkich zanieczyszczeń oraz niezwiązanych cząsteczek DNA z sieci hydrożelu.



Rys.29 Zależność zmian prądów utlenienia od liczby etapów przemywania hydrożeli. Rysunek wstawiony: woltamperogramy cykliczne dla elektroaktywnych zanieczyszczeń po pierwszym etapie płukania dla poszczególnych hydrożeli.

Kolejnym krokiem było oszacowanie całkowitego stężenia DNA zakumulowanego w sieci polimerowej PAM. Oznaczenia dokonano za pomocą techniki ICP - MS i podsumowano w tabeli 4. Rozkład fosforu w badanej próbce mierzono po podzieleniu hydrożelu na trzy części, zgodnie ze zdjęciem przedstawionym poniżej.



Rys. 30. Przykładowe zdjęcie optyczne próbki żelu dsDNA/PAM pokazujące podział części mineralizowanych do szacowania rozmieszczenia dsDNA w żelu.

Porównując zawartość fosforu dla początkowych roztworów DNA i próbek żelu po oczyszczeniu można zauważyć, że około 20% nici dsDNA i 40% nici ssDNA zostało wypłukanych z sieci hydrożelu. Finalne stężenie dwuniciowej formy DNA w hydrożelu wynosiło $40,3 \mu M$ p.z.. Natomiast formy jedn niciowej $30,5 \mu M$ p. z. Porównywano również

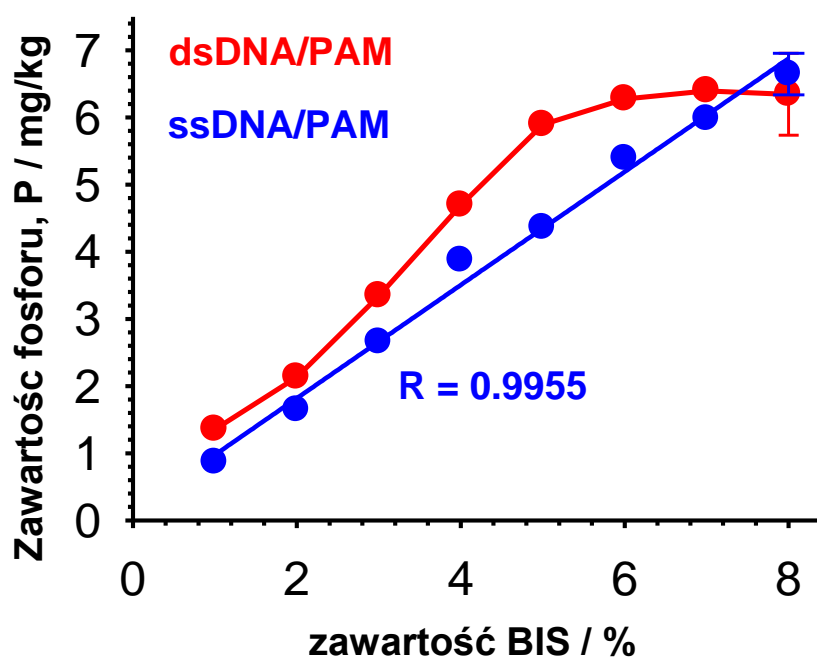
inny sposób wprowadzenia nici do struktury hydrożelu polegający na umieszczeniu skurczonych hydrożeli w roztworach DNA i następnie rozkurczaniu ich. Jednak metoda ta okazała się mniej wydajna. W przypadku tego typu absorpcji w spęczniałych matrycach PAM zidentyfikowano o 27% mniej dsDNA i 23% mniej ssDNA, w porównaniu do sytuacji, w której nici zostały wprowadzone podczas syntezy.

	PAM	ssDNA/PAM	dsDNA/PAM
Zawartość fosforu, P/ (mg/kg)			
Zawartość fosforu roztworów wyjściowych przed wprowadzeniem do żeli	-	7,040 ± 0,95	7,040 ± 0,095
Próbka I	0	3,812±0,02	4.917±0,06
Próbka II	0	5,328±0,02	6.503±0.09
Próbka III	0	5,301±0,01	5,529±0,07
Zawartość fosforu w żelach spęczniałych	0	4,215±0.05	5,650±0,09
Zawartość fosforu w żelach skurczonych	0	4,112±0,02	5,622±0,06
C DNA wprowadzonego podczas syntezy C (μM p.z.)	0	30,5	40,3
Ilość fosforu z żelach (absorbpcja DNA po syntezie)	0	3,215±0,05	4,138±0,09
C (μM p.z.) DNA (absorbpcja DNA po syntezie)	0	23,5	29,4

Tabela 4. Zestawienie oznaczonych wartości stężenia DNA wprowadzonego do różnego typu matryc PAM mierzonego jako zawartość fosforu. Akumulacja DNA zachodziła na dwa sposoby: do żeli spęczniałych podczas syntezy oraz do żeli skurczonych po syntezie.

Korzystając z danych zawartości fosforu w polimerowych matrycach otrzymanych techniką ICP-MS wyznaczono zależność zawartości zaadsorbowanych oligonukleotydów od stopnia usieciowania hydrożeli PAM (%BIS). Badania zostały wykonane dla żeli z różną

zawartością czynnika sieciującego BIS od 1 do 8%. Zależność ilości fosforu od ilości czynnika sieciującego BIS pokazano dla żeli dsDNA/PAM na rysunku 31. Widać, że dla dsDNA zmiana ta ma charakter sigmoidalny z wypłaszczeniem przy wyższych zawartościach BIS, co oznacza, że próbka żelu wysyca się DNA. Przy niższych stopniach usieciowania stopień akumulacji dsDNA w matrycach PAM był niski. W przypadku ssDNA/PAM zależności te były liniowe, co oznacza, że matryca nie została wysycona ssDNA. Po analizie otrzymanych wyników do dalszych badań zastosowaliśmy sieci polimerowe z 6% zawartością BIS.

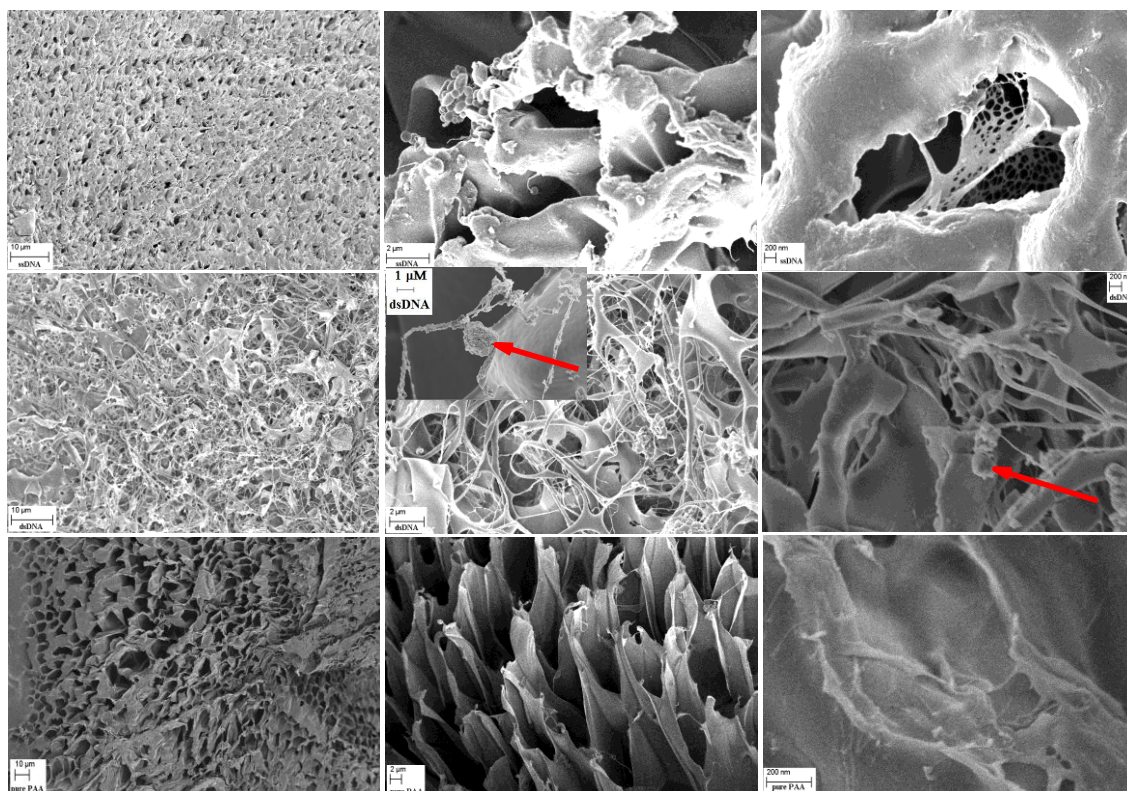


Rys 31. Zależność zawartości procentowej fosforu w matrycach PAM od procentowej zawartości środka sieciującego BIS.

8.1.2. Morfologia

Pierwszym etapem analizy otrzymanych matryc były badania morfologii wykonane techniką SEM. Na rysunku 32 umieszczone zostały mikrografy SEM materiałów opartych na DNA/PAM powstałych po liofilizacji próbek i napyleniu ich stopem pallad/złoto. Zdjęcia wszystkich typów matryc wskazują na porowatą strukturę badanych materiałów. Niezmodyfikowana forma hydrożelu PAM wykazywała większe rozmiary porów w porównaniu do materiałów zmodyfikowanych oligonukleotydami. Można zauważyć, że struktura tego typu hydrożelu jest jednolita, a pory są rozmieszczone równomiernie na całej powierzchni. Materiały oparte na dsDNA charakteryzowały się mniejszą średnicą porów, a w strukturze hydrożelu można zauważyć pojedyncze włókniste elementy. Widoczne są

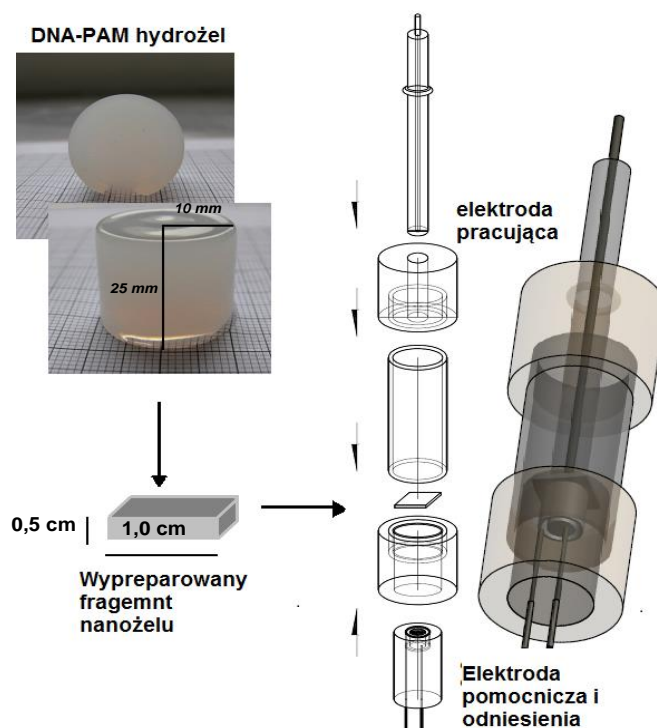
również skręcone koliste nanoformy DNA (nanokłębki dsDNA) o średnicy od 200 do 600 nm. Podobne superhelikalne struktury DNA zostały zauważone podczas enzymatycznej syntezy metamateriałów DNA [250]. Tego typu struktury nie były natomiast widoczne w żelach ssDNA/PAM. Na podstawie danych z SEM oraz za pomocą metody mieszanego wykluczania substancji rozpuszczonej (ang. *mixed- solute- exclusion* - MSE) oszacowano wielkości porów dla poszczególnych hydrożeli [251]. Wynosiły one kolejno 40 - 50 Å dla hydrożeli PAM niezmodyfikowanych, 10 - 20 Å dla hydrożeli dsDNA/PAM i 40 - 300 Å dla ssDNA/PAM.



Rys. 32. Mikrografy SEM uzyskane ze wzrastającym powiększeniem (od lewej do prawej) dla delikatnie zliofilizowanych matryc: ssDNA / PAM (górny rząd), dsDNA / PAM (środkowy rząd) i PAM (dolny rząd). Czerwone strzałki wskazują kłębki, które są widoczne tylko w kompozytach z dsDNA.

8.1.3. Właściwości elektrochemiczne

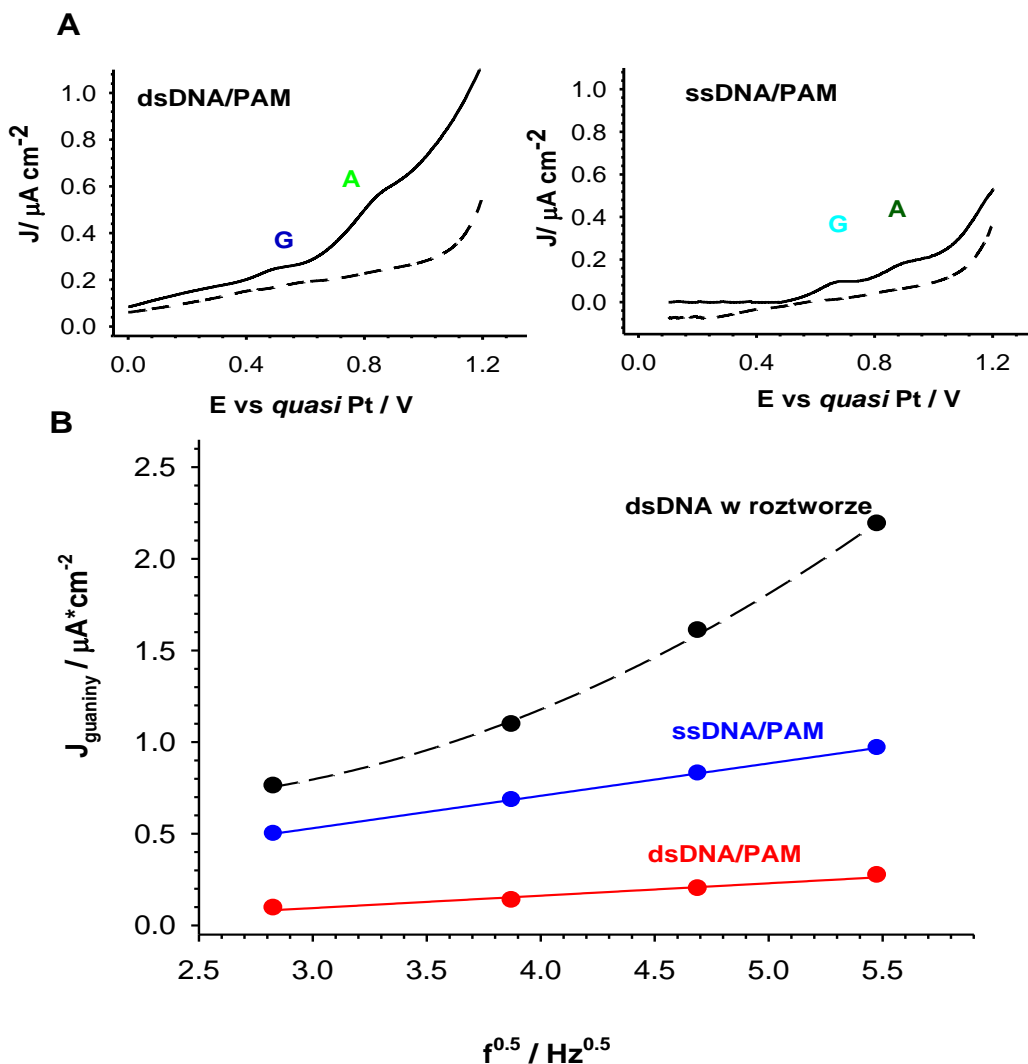
Właściwości elektrochemiczne zsyntezowanych matryc zostały zbadane przy pomocy specjalnie przygotowanego naczynka elektrochemicznego (rys 33). Pomiary elektrochemiczne były prowadzone bezpośrednio bez użycia mediatora. W tym celu do badania zostały wycięte kwadratowe fragmenty żeli o szerokości 1 cm i grubości 0,5 cm. Jako elektrody pracującej użyto elektrody z węgla szklistego (GCE, $r = 3$ mm). Elektroda odniesienia była quasi-odwracalna elektroda Pt. Badano prądy utleniania guaniny i adeniny pochodzące od DNA wprowadzonego do sieci polimerowej hydrożeli.



Rys. 33. Schemat celki pomiarowej służącej do woltamperometrycznego monitorowania elektroaktywnych form obecnych w hydrożelach.

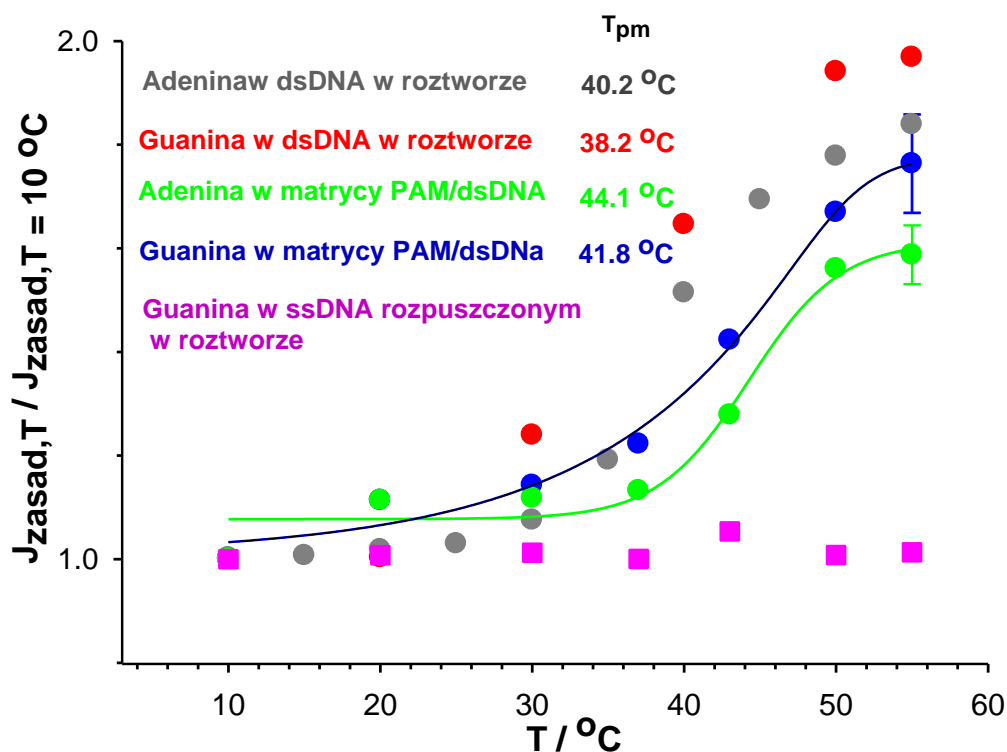
Na rysunku 34A przedstawione zostały woltamperogramy SW poszczególnych zasad DNA wprowadzonych do matryc PAM. Możemy zaobserwować piki pochodzące od zasad azotowych zarówno dla ssDNA jak i dsDNA w matrycy PAM. W przypadku ssDNA/PAM potencjał dla guaniny wynosił $0,65 \pm 0,05$ V, a adeniny $0,90 \pm 0,03$ mV. Natomiast dla dsDNA/PAM piki zasad azotowych zostały przesunięte w kierunku mniej dodatnich potencjałów (dla guaniny $E_p = 0,49 \pm 0,07$ V, dla adeniny $E_p = 0,81 \pm 0,05$ V). Wysokości pików zasad azotowych były dla dsDNA o 50% wyższe niż dla ssDNA znajdującego się w matrycy PAM.

Bardzo ciekawy efekt pojawił się w zależnościach wysokości prądów guaniny od pierwiastka z częstotliwości (rysunek 34B). Są one dla obu kompozytów liniowe (z różnym nachyleniem), w przeciwieństwie do pomiarów DNA rozpuszczonego w roztworze. Można wnioskować, że odpowiedź prądowa ma bardziej charakter dyfuzyjny, co może wiązać się wzmożonym przewodzeniem DNA unieruchomionego w matrycy PAM i osłabieniem adsorpcji DNA na powierzchni elektrody.



Rys 34. (A) Woltamogramy SW otrzymane dla 38,2 μM ssDNA i dsDNA w matrycach PAM (linie ciągłe). Linia przerywana odpowiada buforowi fosforanowemu $T = 20^{\circ} C$, $f = 20$ Hz. G-guanina, A - adenina. (B) Zależności wysokości pików od pierwiastka kwadratowego z częstotliwości SW uzyskane dla: roztworu dsDNA w PBS (czarny), ssDNA/PAM (niebieski) i dsDNA/PAM (czerwony).

Przeprowadzono również badania elektrochemiczne zasad azotowych w zależności od temperatury. Rysunek 35 przedstawia znormalizowane gęstości prądów guaniny i adeniny w hydrożelach PAM oraz w roztworze wykreślone w funkcji temperatury.



Rys 35. Znormalizowane gęstości prądu SW dla guaniny i adeniny w różnych temperaturach dla dsDNA. i ssDNA mierzone w roztworze buforowym oraz matrycy PAM. Temperatury T_{pm} w połowie krzywych są to temperatury topnienia dsDNA.

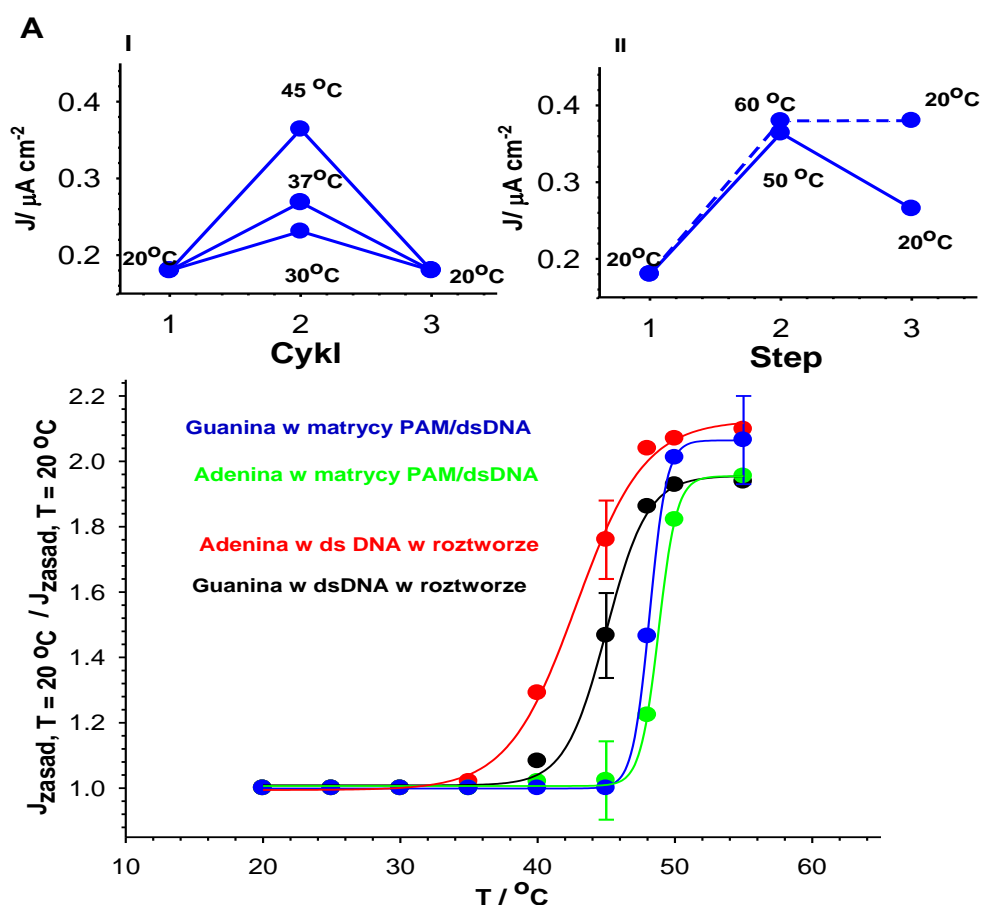
Na rysunku możemy zaobserwować wzrost prądu zasad azotowych dla temperatury wyższej od 30 °C. Jest on spowodowany zmianami w strukturze dsDNA i zmianą mechanizmu utleniania guaniny z 2 do 4 e [252]. Wyniki przedstawione dla żeli dsDNA/PAM pokazują, że wzrost prądu zaczyna się w nieco wyższych temperaturach niż w roztworze, co sugeruje, że matryca hydrożelowa utrudnia rozluźnienie nici dsDNA uwięzionej w matrycy PAM. Temperatura, w której prąd zaczyna wzrastać jest to temperatura topnienia oligonukleotydów. Zaobserwowałam, że wartości tej temperatury są wyższe dla dsDNA w matrycy PAM.

Trzeba nadmienić, że zmiany w strukturze DNA można monitorować z większą czułością metodami elektrochemicznymi niż metodami spektroskopowymi. Dzięki zastosowaniu metod woltamperometrycznych możliwe jest badanie lokalnych subtelnych zmian konformacyjnych dsDNA w temperaturach niższych niż temperatura topnienia T_{pm} [253].

Zbadałam również zmiany pików SWV zasad azotowych w cyklach grzania do wysokich temperatur i chłodzenia próbek dsDNA w matrycach PAM i porównałam z próbkami DNA w roztworze. Temperaturą początkową była temperatura 20 °C. Następnie próbka była grzana do zadanej temperatury i chłodzona do 20 °C. Na rysunku 36A obserwujemy zmiany gęstości prądów utleniania guaniny podczas cykli grzania i chłodzenia dla kompozytów dsDNA/PAM.

Możemy zaobserwować, że po podgrzaniu do temperatury nie wyższej niż 45 °C prądy rosną, a po ochłodzeniu wracają do swojej początkowej wartości. Natomiast, jeżeli podgrzejemy żele do temperatury powyżej 50 °C prądy nie wracają do swojej początkowej wartości i zmiany zachodzące w dsDNA są nieodwracalne. Niewątpliwie nieodwracalność tych zmian związana jest z denaturacją podwójnej nici dsDNA.

Na rysunku 36B przedstawione są znormalizowane gęstości prądu dla zasad azotowych w matrycy dsDNA/PAM oraz w roztworze, zmierzone po cyklach grzania i chłodzenia. Możemy zaobserwować, że dla dsDNA umieszonego w żelach zakres odwracalności gęstości prądu jest szerszy w stosunku do dsDNA rozpuszczonego w roztworze. Do temperatury 45 °C prądy guaniny po cyklu grzania i chłodzenia wracają do swojej początkowej wartości. Natomiast w przypadku dsDNA rozpuszczonego w roztworze wzrost prądu zachodzi już przy około 35 °C. Wyniki te potwierdzają założenie, że matryca polimerowa chroni nieco dsDNA przed nieodwracalnymi zmianami w jego strukturze spowodowanymi wzrostem temperatury.



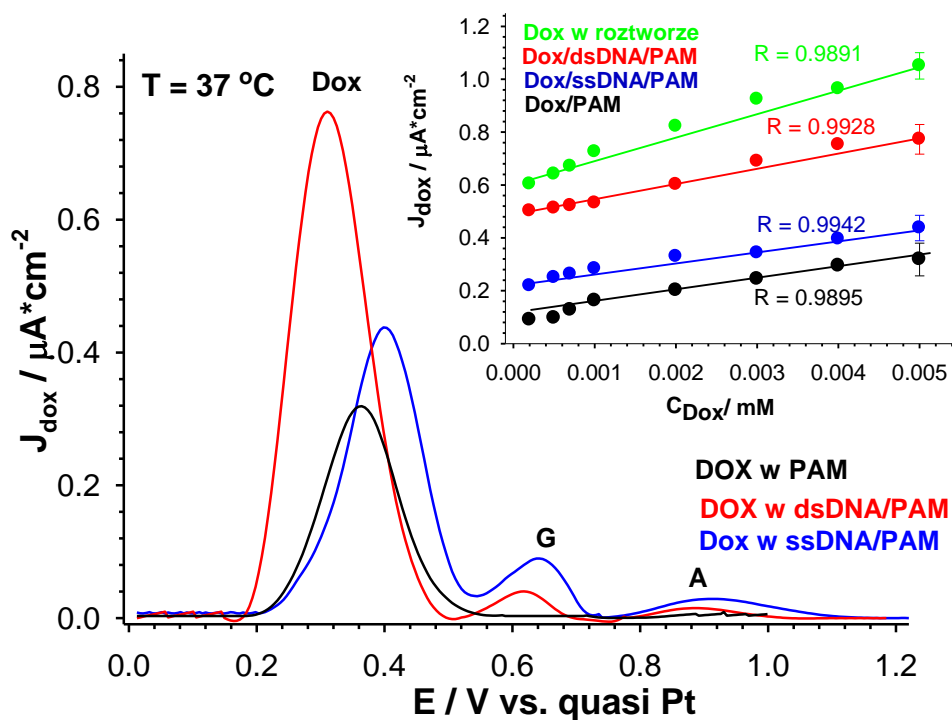
Rys 36. (A) Zależności gęstości prądów guaniny uzyskane w sekwencji trzech temperatur, I - cykle odwracalne, II - cykle nieodwracalne. (B) Znormalizowane prądy SW guaniny i adeniny w dsDNA/PAM i w roztworze uzyskane po cyklach grzania i chłodzenia.

8.1.4. Zastosowanie matryc hydrożelowych do uwalniania leków

Do analizy uwalniania leku z matryc hydrożelowych jako leku modelowego użyto interkalatora - doksorubicyny (Dox). Doksorubicyna była uwalniana z hydrożelu po zastosowaniu podwyższonej temperatury. Wprowadzono też element przełącznikowy polegający na skokowych zmianach temperatury i monitorowaniu uwalniania leku. Do identyfikacji ilości uwolnionego leku posłużyły piki grup chinonowych i hydrochinonowych obecnych w strukturze Dox.

W celu ustalenia charakteru oddziaływań doksorubicyny z dsDNA wprowadzonym do matrycy hydrożelowej zarejestrowano woltamperogramy SW dla Dox zakumulowanego do poszczególnych typów hydrożeli. Akumulację prowadzono z 0,001 mM roztworu przez 30 min. Na rysunku 37 obserwujemy piki doksorubicyny zarejestrowane w hydrożelach modyfikowanych DNA oraz hydrożelach bez materiału genetycznego. Wiadomo, że oddziaływania płaskich związków z dsDNA mogą obejmować dwa rodzaje interakcji niekowalencyjnych tj.: interkalacja - oddziaływania silne oraz oddziaływania elektrostatyczne – słabe. W żelach PAM bez obecności DNA zarejestrowano pik utleniania Dox przy potencjale $0,31 \pm 0,05$ V. W hydrożelach dsDNA/PAM nastąpił znaczny wzrost wysokości piku Dox w stosunku do żeli niezmodyfikowanych. Wskazuje to na znaczną akumulację w skutek interkalacji. W przypadku hydrożeli ssDNA/PAM wysokości prądów również wzrosły w stosunku do hydrożeli niezmodyfikowanych, jednak wzrost ten był mniejszy w porównaniu do podwójnej nici DNA. Ponieważ stężenie ssDNA i dsDNA w żelach PAM było bardzo podobne, porównanie wysokości sygnałów woltamperometrycznych Dox pozwoliło stwierdzić, że słabe oddziaływania elektrostatyczne przyczyniają się w mniejszym stopniu do związania Dox z ssDNA w sieciach PAM.

Zależność gęstości prądu Dox (w żelu) od pierwiastka kwadratowego z częstotliwości SW była liniowa, co wskazuje na dyfuzyjny transport elektronów. Uzyskane liniowe wykresy kalibracji maksymalnych prądów anodowych Dox względem stężenia Dox (0,001 mM - 0,05 mM) w 0,1 M PBS, pH 7,4 przedstawiono na rysunku wstawionym do rys. 37.



Rys 37. Woltamogramy SW dla 0,001 mM Dox zaadsorbowanego w żelach po 30-minutowej akumulacji. PAM (linia czarna), dsDNA / PAM (linia czerwona) i ssDNA / PAM (linia niebieska), $T = 20\text{ }^{\circ}\text{C}$, $f = 20\text{ Hz}$. G-guanina, A - adenina. Rysunek wstawiony: zależności gęstości prądu Dox zakumulowanego w poszczególnych sieciach DNA/PAM ($E = 0,35 \pm 0,5\text{ V}$) od wzrastającego stężenia Dox.

Kolejnym etapem badań było określenie parametrów wiązania K i n dla interakcji Dox z DNA w sieciach polimerowych w temperaturze fizjologicznej ($37\text{ }^{\circ}\text{C}$) i w $45\text{ }^{\circ}\text{C}$. Parametry te obliczono stosując model McGhee-von Hippel'a. Równanie opisujące interakcje między łańcuchami dsDNA a planarną cząsteczką doksorubicyny ma postać:[254]

$$\frac{r}{C_f} = K(1 - nr) \left[\frac{1 - nr}{1 - (n - 1)r} \right]^{n-1} \quad (13)$$

Gdzie:

K - stała wiązania leku do DNA,

n - liczba wiążących jednostek łańcucha, które są zajęte przez jedną cząsteczkę ligandu,

$r = C_b / C_{\text{matrix}}$ a $C_b = C_0 - C_f$,

C_b - stężenie ligandu związanego z dwuniciowymi oligonukleotydami,

C_0 - całkowite stężenie ligandu,

C_f - stężenie wolnych cząsteczek ligandu w roztworze,

C_{matrix} - analityczne stężenie miejsca wiązania leku w dwuniciowych oligonukleotydach.

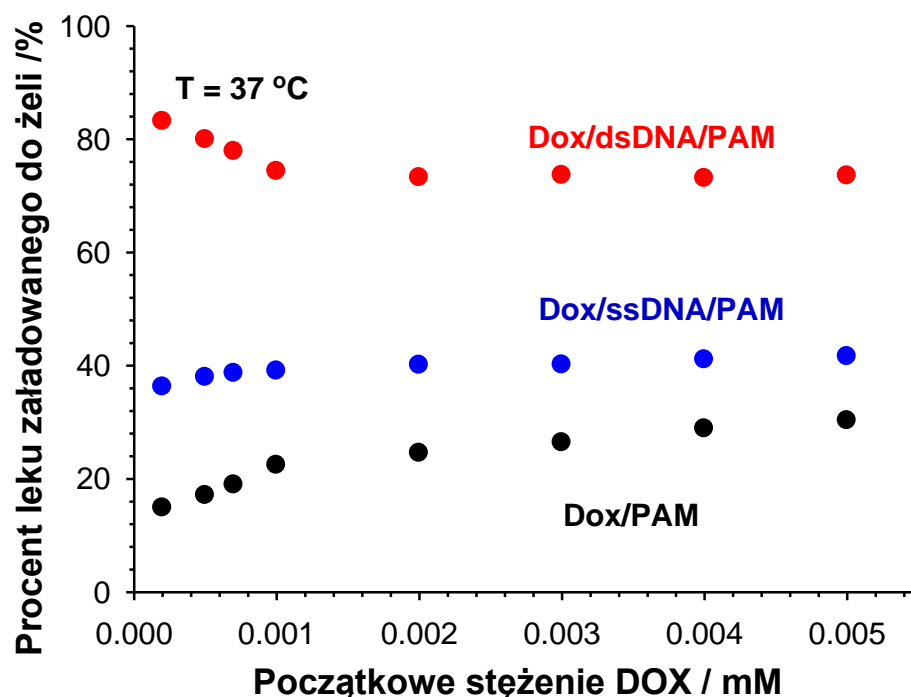
Wyniki uzyskane dzięki wykorzystaniu równania 2 zostały przedstawione w tabeli 5.

Parametry wiązania Dox z dsDNA w roztworze		
	T = 37 °C	T = 45 °C
K ± s(K) / M⁻¹	(2,01±0,001) · 10⁵	(1,23±0,005) · 10⁵
n	2,21±0,1	4,23±0,2
R	0,9963	0,9941
Parametry wiązania Dox dla matryc hydrożelowych T = 37 °C		
	ssDNA/PAM	dsDNA/PAM
K ± s(K) / M⁻¹	(3,29±0,007) · 10⁴	(1,65±0,091) · 10⁵
n	1,94±0,02	1,22±0,01
R	0,9907	0,9949
Parametry wiązania Dox dla matryc hydrożelowych T = 45 °C		
	ssDNA/PAM	dsDNA/PAM
K ± s(K) / M⁻¹	(2,64±0,003) · 10⁴	(1,08±0,040) · 10⁵
n	2,12±0,01	1,48±0,08
R	0,9894	0,9921

Tabela 5. Parametry *K* i *n* określające wiązanie Dox z molekulą DNA w matrycach hydrożelowych PAM i w roztworze.

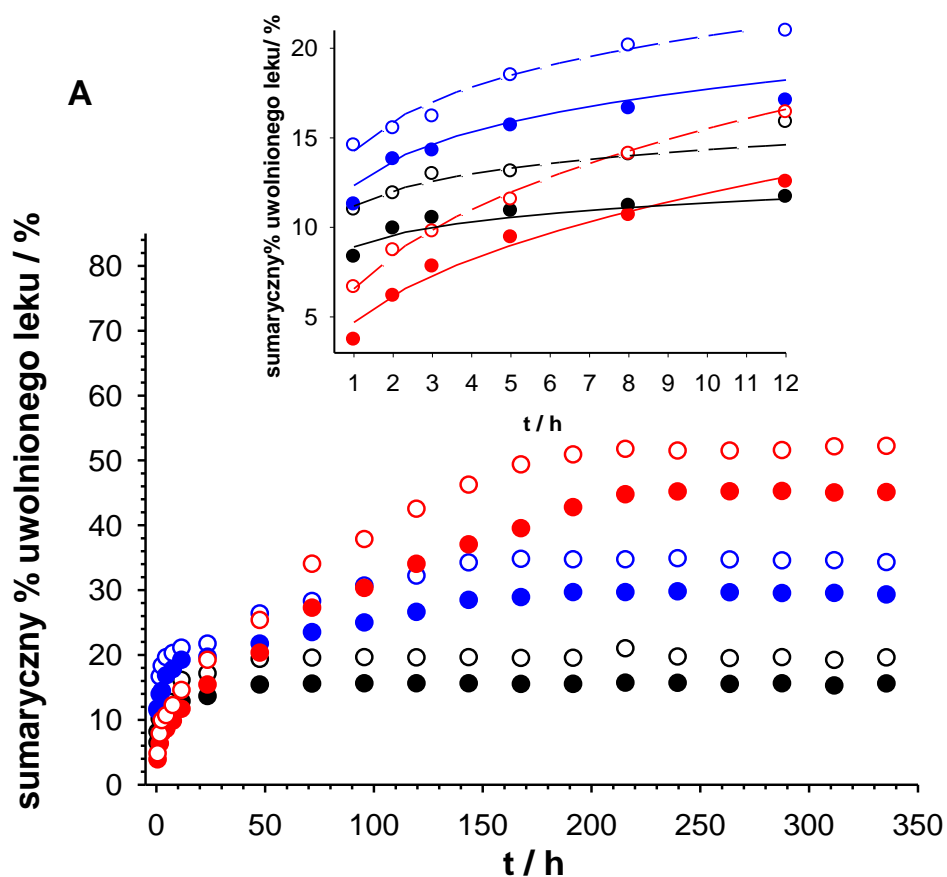
Analizując powyższe wyniki widzimy, że wzrost temperatury doprowadził do spadku wartości stałych oddziaływania *K*, co jest efektem pożądanym w przypadku interkalacji. Wartości parametru *n* dla matryc polimerowych zostały tylko nieznacznie zmienione, podczas gdy w roztworze wartość ta znacząco rosła. Brak wzrostu parametru *n* dla hydrożeli DNA/PAM był spowodowany prawdopodobnie zmniejszoną dostępnością miejsc aktywnych w unieruchomionym dsDNA. Natomiast spadek wartości *K* w wyższych temperaturach związany był z miejscowym rozluźnianiem się nici dsDNA, co mogło powodować ograniczenie interkalacji.

Zbadano również zakres akumulacji dokсорubicyny do hydrożeli w zależności od stężenia początkowego roztworu Dox. Największy stopień akumulacji osiągnięto dla hydrożeli dsDNA/PAM, mniejszy dla ssDNA/PAM i najmniejszy dla niezmodyfikowanych żeli PAM. Procent absorpcji leku z roztworu dla hydrożeli dsDNA/PAM wynosił maksymalnie 80%. Zmiany procentowej zawartości leku w matrycach w stosunku do wzrastającego stężenia początkowej ilości Dox zostały przedstawione na rysunku 38.



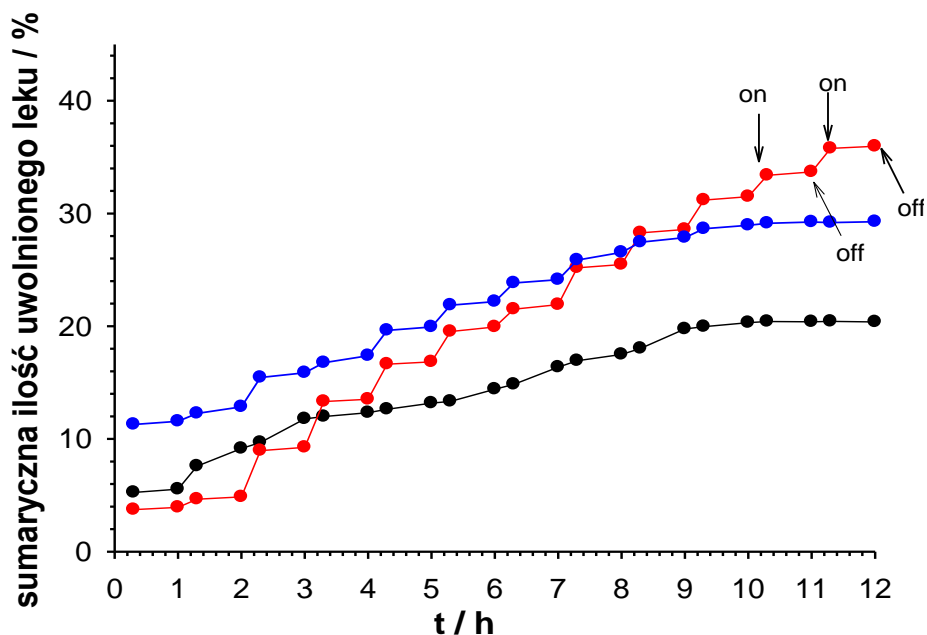
Rys. 38. Procent zaabsorbowanej dokсорubicyny z jej roztworów. Matryce: PAM (czarne punkty), dsDNA / PAM (niebieskie punkty) i ssDNA / PAM (czerwone punkty). Pomiar techniką UV-Vis. Absorpcję mierzono po 30 minutach akumulacji leku.

Ostatnim etapem badań było przeprowadzenie uwalniania leku zakumulowanego do nośników. Profile uwalniania leku zostały opracowane przy wykorzystaniu danych pochodzących z woltamperometrii SW. Rysunek 39 przedstawia skumulowane względne profile uwalniania leku z badanych hydrożeli polimerowych. Głównym czynnikiem powodującym zwiększone uwalnianie leku była podwyższona temperatura (37 i 45 °C) rutynowo stosowana w terapii hipertermicznej. Przedstawione profile uwalniania pokazują, że najwięcej leku uwolniło się z hydrożeli dsDNA/PAM, następnie z ssDNA/PAM a najmniej z hydrożeli niezmodyfikowanych. Gdy temperatura wzrosła do 45 °C, nastąpiło zwiększone uwalnianie leku z każdego typu matryc.



Rys. 39. Względne profile uwalniania dokсорubicyny z matryc PAM (czarne punkty, stężenie max 1,8 μmol), dsDNA / PAM (czerwone punkty, stężenie max 5 μmol) i ssDNA / PAM (niebieskie punkty, stężenie max 2,5 μmol). Temperatura: 37 °C (kółka wypełnione), 45 °C (kółka puste.) Rysunek wstawiony: początkowe profile uwalniania z dopasowanymi liniami według modelu Peppas'a dla poszczególnych matryc.

Uwalnianie leku z matryc hydrożelowych może przebiegać również w sposób nieciągły poprzez przełączanie temperatury pomiędzy 37 a 45 °C. Profil uwalniania leku z matryc PAM w takim systemie pokazano na rysunku 40. Każdy cykl zmiany temperatury trwał 60 minut. Ilość Dox uwalniana w kolejnych cyklach wzrastała szybciej w porównaniu do uwalniania w stałej temperaturze. Ta różnica była szczególnie widoczna w przypadku hydrożeli dsDNA/PAM.



Rys. 40. Profile uwalniania dokсорubicyny z hydrożeli PAM (czarne punkty), dsDNA/PAM (niebieskie punkty), ssDNA/PAM (czerwone punkty) wykonane w sposób nieciągły z przełączaniem temperatury z 37 do 45 °C. Długość cyklu zmiany temperatury 60 minut.

Proces uwalniania leku z matryc hydrożelowych był analizowany przy pomocy empirycznego modelu Peppas’a. Model ten charakteryzuje równanie:[255]

$$\frac{M_t}{M_f} = kt^n \quad (14)$$

gdzie:

M_t - ilość uwolnionego leku po czasie t ,

M_f - początkowa ilość leku,

k - stała szybkości uwzględniającą strukturę nośnika zawierającego lek,

t - czas,

n - wykładnik dyfuzyjny zależny od mechanizmu uwalniania i geometrii nośnika.

W przypadku dyfuzyjnego uwalniania leku, parametr n ma ustalone wartości. Dla uwalniania leku z płytek jego wartość wynosi maksymalnie: 0,50 z nośników o budowie cylindrycznej: 0,45. Natomiast z nośników kulistych 0,43 [256,257]. Jeśli wartość n wykracza poza powyższy zakres zachodzi inny typ transportu tzw. dyfuzja anormalna. Ten typ transportu odnosi się do sytuacji, w której mechanizm uwalniania jest połączeniem dyfuzji oraz jednoczesnego pęcznienia lub kurczenia się polimeru.

W tabeli 6 zostały zawarte parametry uwalniania dokсорubicyny z matryc PAM obliczone za pomocą modelu Peppas’a.

Parametry uwalniania Dox 0-24 godzin			
	PAM	ssDNA/PAM	dsDNA/PAM
T = 37 °C			
<i>k</i>	0,677	0,862	0,890
<i>n</i>	0,245	0,401	0,417
<i>r</i>	0,983	0,979	0,999
T = 45 °C			
<i>k</i>	0,598	0,850	0,976
<i>n</i>	0,547	0,600	0,608
<i>r</i>	0,982	0,982	0,989
Parametry uwalniania Dox 24-192 godzin			
T = 37 °C			
<i>k</i>	0,946	0,520	0,419
<i>n</i>	0,005	0,540	0,518
<i>r</i>	0,963	0,994	0,993
T = 45 °C			
<i>k</i>	1,024	0,329	0,458
<i>n</i>	0,008	0,568	0,655
<i>r</i>	0,973	0,995	0,993
Parametry uwalniania 192-360 godzin			
T = 37 °C			
<i>k</i>	0,963	0,860	0,731
<i>n</i>	0,501	0,603	0,620
<i>r</i>	0,982	0,990	0,985
T = 45 °C			
<i>k</i>	1,128	1,039	0,629
<i>n</i>	0,009	0,613	0,710
<i>r</i>	0,974	0,983	0,997
Parametry uwalniania Dox 0 - 360 godzin, 37 ↔ 45 °C			
<i>k</i>	0,477	0,550	1,350
<i>n</i>	0,423	0,637	0,638
<i>r</i>	0,980	0,979	0,995

Tabela 6. Wartości parametrów uwalniania Dox obliczone za pomocą modelu Peppas'a dla żeli PAM, ssDNA/PAM i dsDNA/PAM. *k*-stała szybkości uwalniania leku, *n* - wykładnik dyfuzyjny, *r* - współczynnik korelacji.

Z danych w powyższej tabeli można wnioskować, że występowały trzy różne mechanizmy uwalniania leku w zależności od przedziałów czasowych. Można stwierdzić, że: a) w stosunkowo krótkim czasie (do 24 godzin) w temperaturze fizjologicznej uwalnianie było dyfuzyjne dla wszystkich typów matryc, natomiast w temperaturze 45 °C występowała dyfuzja anormalna b) w dłuższych czasach (24 - 200 h) uwalnianie było dyfuzyjne dla niezmodyfikowanych żeli PAM natomiast dla żeli zawierających DNA następował transport anormalny w przypadku dwóch zadanych temperatur c) w przypadku najdłuższych czasów (200 - 360 h) uwalnianie było znikome w przypadku PAM i niedyfuzyjne (dyfuzja anormalna) w przypadku pozostałych materiałów. Uwolnienie leku uległo poprawie, gdy temperatura była poddawana cyklizacji między 37 °C a 45 °C. Uwalnianie tego typu było dyfuzyjne dla matryc PAM i ssDNA/PAM, natomiast dla matryc dsDNA/PAM występowała dyfuzja anormalna.

8.1.5. Podsumowanie

Uzyskane wyniki sugerują, że możliwe jest trwałe unieruchomienie dsDNA w matrycy polimerowej bez konieczności tworzenia wiązań kowalencyjnych między DNA a strukturą polimerową. Wydajność wprowadzenia DNA do hydrożeli była zadowalająca i wynosiła 80% (w stosunku do ilości początkowej) w przypadku podwójnych nici DNA a 60% w przypadku jednoniciowych form.

Ponadto udowodniono, że możliwe jest bezpośrednie monitorowanie zmian strukturalnych cząsteczek DNA obecnych w sieci hydrożelu za pomocą metod elektrochemicznych. Wykazano również, że techniki elektrochemiczne pozwalają na obserwację lokalnych zmian przeddenaturacyjnych w DNA związanych z rozplątywaniem nici i zmianą konformacji, co nie jest możliwe przy pomocy metod spektroskopii UV-Vis. Ważnym aspektem tych badań było ukazanie bezpośrednio pików utleniania zasad azotowych w sieci hydrożeli. Monitorowanie zmian tych pików w zależności od temperatury dało nam możliwość kontroli procesu denaturacji nici DNA.

Co najważniejsze, udowodniono, że hydrożele PAM/DNA umożliwiają skuteczną akumulację doksorubicyny poprzez interkalację leku do podwójnej helisy DNA. Do hydrożeli zmodyfikowanych dsDNA zakumulowało 80% początkowej ilości leku. Uwolnienie leku z matrycy pod wpływem temperatury zachodziło na drodze denaturacji podwójnej nici DNA i miało również miejsce w temperaturach stosunkowo niższych od temperatur topnienia oligonukleotydów. Dodatkowo, stosując system oscylowania temperatury między 37 a 45 °C uzyskano wyższe wyniki uwalniania leku z matryc, co poprawia efektywność i wskazuje ich zastosowanie jako potencjalne nośniki uwalniania leków przeciwnowotworowych.

9. Nanohydrożele modyfikowane DNA

W mojej pracy eksperymentalnej otrzymałam serię materiałów hydrożelowych w skali nano zawierających kowalencyjnie wbudowane nici ssDNA oraz dsDNA. Krótkie odcinki oligonukleotydów były wprowadzane do sieci polimerowej za pomocą grup akrylowych jak i ugrupowania PEG2000. Jako matrycy polimerowej używałam sieci poli(*N*-izopropyloukryloamidowej) (PNIPA) zmodyfikowanej kwasem akrylowym (AAc). Syntezy żeli były prowadzone przy użyciu standardowego środka sieciującego N-metylenobisarylamidu oraz bez jego obecności za pomocą wyselekcjonowanych odcinków DNA, które ulegały hybrydyzacji podczas procesu polimeryzacji. Zsyntezowałam również nanocząstki zawierające odcinki DNA zmodyfikowane mostkami disiarczkowymi -SS- rozszczepiające się pod wpływem reduktorów takich jak glutation. W niniejszym rozdziale przedstawiłam różne typy nanocząstek zmodyfikowanych materiałem genetycznym oraz wpływ modyfikacji na właściwości fizykochemiczne danych układów pod kątem uwalniania i akumulacji leków przeciwnowotworowych.

9.1. Nanożele sieciowane BIS i modyfikowane hybrydą DNA

Pierwszym etapem moich badań była synteza nanożeli gdzie zastosowano standardowy środek sieciujący i specjalnie zaprojektowany układ nici DNA tworzących trzysegmentową hybrydę. Podczas procesu polimeryzacji zostały wprowadzone dwie nici DNA, które nie były komplementarne wobec siebie. Natomiast po procesie polimeryzacji dołączono trzecią nić komplementarną w połowie do obydwu nici przyłączonych do sieci. Tego typu modyfikacja została wprowadzona z założeniem, że podwójna nić DNA będzie rezerwuarem leku przeciwnowotworowego, który będzie interkalował pomiędzy pary zasad. Czynnikiem uwalniającym zakumulowany lek miała być podwyższona temperatura, w której następowałoby skurczenie sieci polimerowej i denaturacja podwójnych nici DNA, a co za tym idzie uwolnienie leku z matrycy.

Aby dokładnie wybrać odpowiednią sekwencję zasad i warunki syntezy, przeprowadzono symulacje komputerowe. Wstępne założenia zbadano wykorzystując energie minimalne struktur w danych temperaturach oraz zależności między stanem niezhybrydyzowanym i zhybrydyzowanym wybranych odcinków nici DNA.

Na rysunku 41 przedstawiono prawdopodobieństwo zajścia hybrydyzacji pomiędzy konkretnymi zasadami w wybranych sekwencjach DNA w dwóch różnych temperaturach. W temperaturze 37 °C obserwujemy niskie prawdopodobieństwo hybrydyzacji, co sugerują

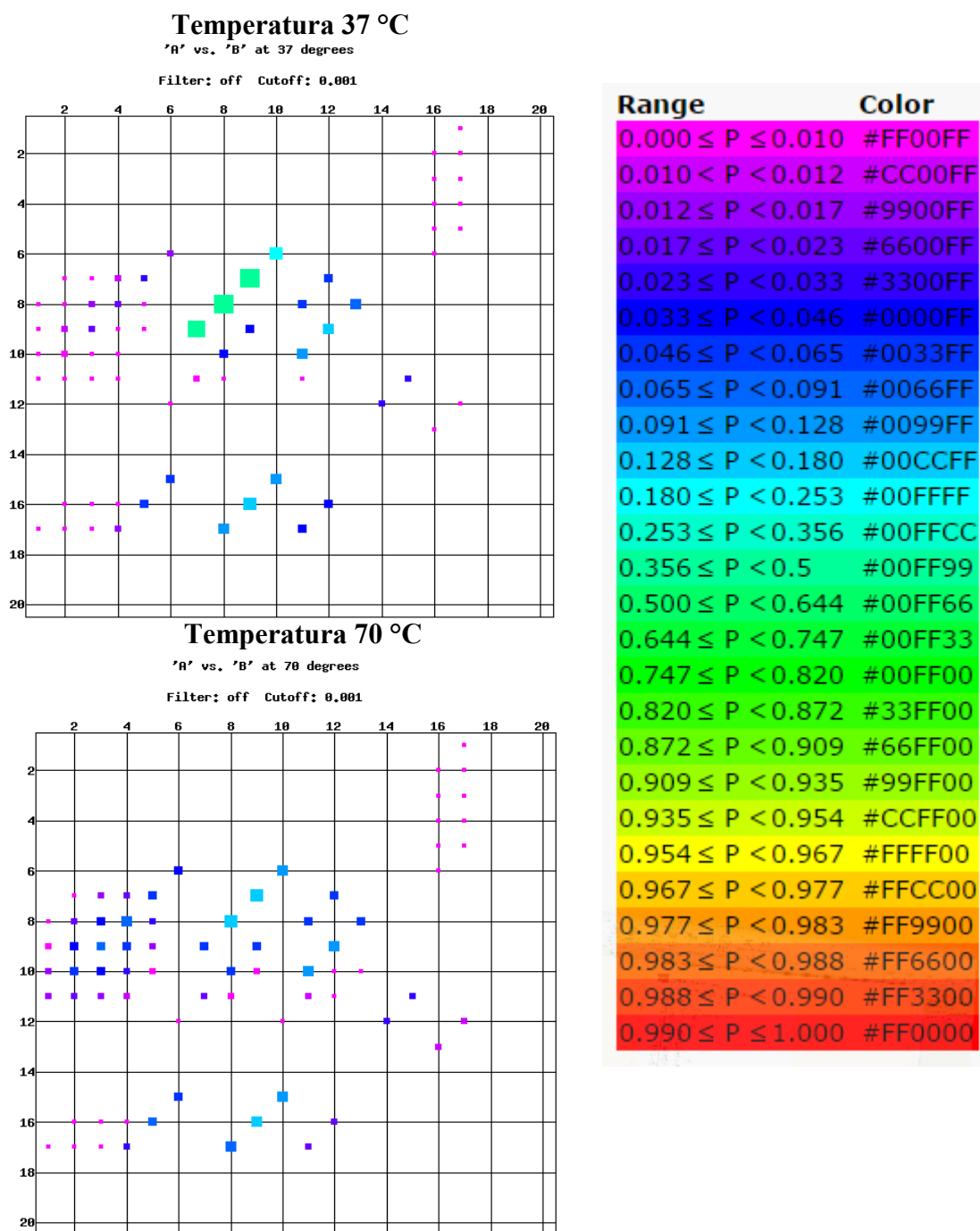
nam kolory odpowiadające niskiemu współczynnikowi prawdopodobieństwa. Istnieje jednak możliwość tworzenia homodimerów w okolicach 10 zasady azotowej, czyli w połowie nici. Tego rodzaju układ został zaprojektowany w celu zwiększenia prawdopodobieństwa znalezienia się obu oligonukleotydów blisko siebie.

W kolejnej symulacji przedstawiono podobną sytuację dla temperatury 70 °C, czyli temperatury, w jakiej zachodzi polimeryzacja monomerów NIPA. Po podwyższeniu temperatury układu prawdopodobieństwo hybrydyzacji oligo1 i oligo2 statystycznie zmniejszało się. Wyniki symulacji stały się podstawą do zaprojektowania odpowiednich warunków syntezy pozwalających na wprowadzenie obu odcinków do sieci i uniknięcie ich hybrydyzacji między sobą.

Prawdopodobieństwo hybrydyzacji dla sekwencji oligo1 i oligo 2:

A 5' Acryd-GGGGG-GCTCTTGGAACT 3'

B 5' Acryd GGGGG-TGAGTAGACACT 3'



Rys. 41. Wykresy „A” vs. „B” symulacji możliwości hybrydyzacji odcinków oligo 1 i oligo 2, prowadzone w temperaturach 37 i 70 °C.

Kolejnym etapem było sprawdzenie prawdopodobieństwa dołączenia nici komplementarnej do układu dwóch nici wprowadzonego kowalencyjnie do sieci nanożelu.

Symulacje te prowadzono dla różnych temperatur. Na rysunku 42 obserwujemy prawdopodobieństwo zajścia tego typu hybrydyzacji w temperaturze 60 i 4 °C.

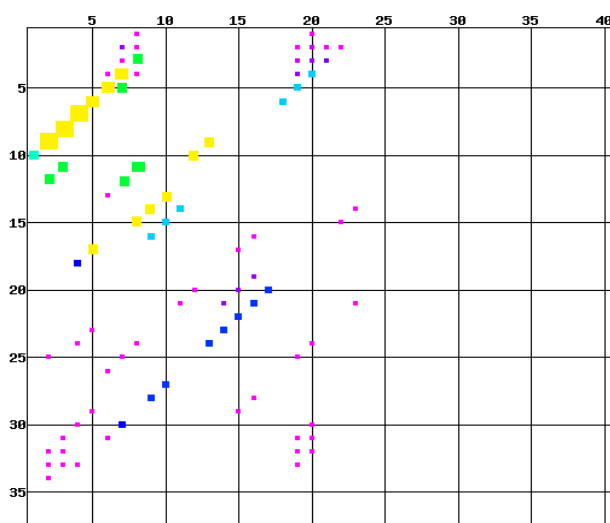
Prawdopodobieństwo hybrydyzacji dla układu nici oligo1 i oligo2 z nicią oligo3:

A 5' Acryd GGGGG-**TGAGTAGACACTGCTCTTGGA**ACT-GGGGG Acryd-3'
B 3' **ACTCATCTGTGACGAGAACCTTGA** 5'

Temperatura 4 °C

'A' vs. 'B' at 4 degrees

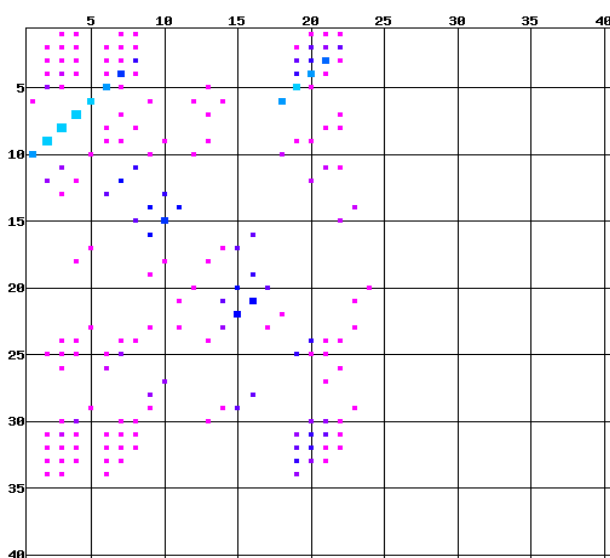
Filter: off Cutoff: 0.001



Temperatura 60 °C

'A' vs. 'B' at 60 degrees

Filter: off Cutoff: 0.001



Range	Color
$0.000 \leq P \leq 0.010$	#FF00FF
$0.010 < P < 0.012$	#CC00FF
$0.012 \leq P < 0.017$	#9900FF
$0.017 \leq P < 0.023$	#6600FF
$0.023 \leq P < 0.033$	#3300FF
$0.033 \leq P < 0.046$	#0000FF
$0.046 \leq P < 0.065$	#0033FF
$0.065 \leq P < 0.091$	#0066FF
$0.091 \leq P < 0.128$	#0099FF
$0.128 \leq P < 0.180$	#00CCFF
$0.180 \leq P < 0.253$	#00FFFF
$0.253 \leq P < 0.356$	#00FFCC
$0.356 \leq P < 0.5$	#00FF99
$0.500 \leq P < 0.644$	#00FF66
$0.644 \leq P < 0.747$	#00FF33
$0.747 \leq P < 0.820$	#00FF00
$0.820 \leq P < 0.872$	#33FF00
$0.872 \leq P < 0.909$	#66FF00
$0.909 \leq P < 0.935$	#99FF00
$0.935 \leq P < 0.954$	#CCFF00
$0.954 \leq P < 0.967$	#FFFF00
$0.967 \leq P < 0.977$	#FFCC00
$0.977 \leq P < 0.983$	#FF9900
$0.983 \leq P < 0.988$	#FF6600
$0.988 \leq P < 0.990$	#FF3300
$0.990 \leq P \leq 1.000$	#FF0000

Rys. 42. Wykresy „A” vs. „B” symulacji możliwości hybrydyzacji odcinków oligo 1 i 2 z odcinkiem oligo 3 prowadzone w temperaturze 4 i 60 °C.

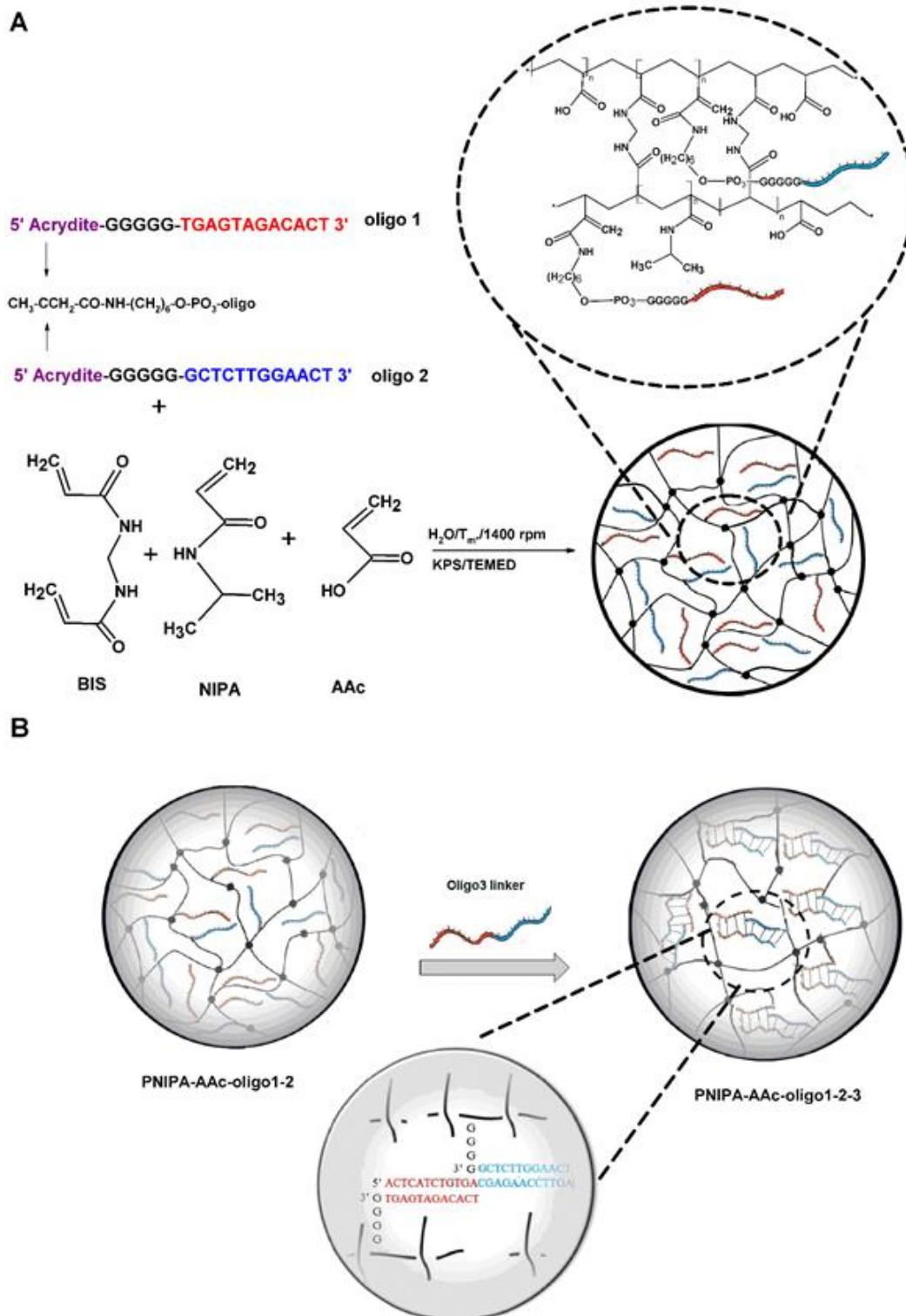
Na powyższym wykresie obserwujemy, że w temperaturze 60 °C prawdopodobieństwo zajścia hybrydyzacji pomiędzy wybranymi odcinkami jest dość niskie. Jednak po obniżeniu temperatury prawdopodobieństwo to znacznie rośnie. Patrząc na wykres w 4 °C widzimy żółty kolor symbolizujący wysokie prawdopodobieństwo hybrydyzacji zaczynając od 5 pary zasad. Uzyskane wyniki były podstawą, aby prowadzić hybrydyzację w łaźni lodowej, co znacznie obniżyło temperaturę i zwiększyło prawdopodobieństwo hybrydyzacji pomiędzy wybranymi parami zasad.

9.1.1. Synteza

Zsyntezowane zostały różne typy nanożeli zawierających kowalencyjnie wprowadzone oligonukleotydy:

- PNIPA-AAc-oligo12 – nanożel z wprowadzonymi niciami oligo 1 i 2,
- PNIPA-AAc-oligo123 – nanożel z wprowadzonymi niciami oligo1 i oligo2 oraz dołączoną komplementarną nicią oligo3,
- PNIPA-AAc-oligo1 - nanożel z wprowadzoną nicią oligo 1,
- PNIPA-AAc-oligo2 - nanożel z wprowadzoną nicią oligo 2,
- PNIPA-AAc – nanożel bez oligonukleotydów.

Nanożele otrzymywane były z wykorzystaniem polimeryzacji emulsyjnej bez udziału środków powierzchniowo czynnych. Schemat syntezy przedstawiony jest na rysunku 43A. [258].



Rys. 43. (A) Schemat syntezy nanożeli PNIPA-AAC-oligo12 z wbudowanymi kowalencyjnie oligonukleotydami, (B) proces hybrydyzacji trzysegmentowej w nanożelu.

Głównym elementem sieci polimerowej był monomer NIPA w połączeniu z kwasem akrylowym (AAC). Jako środka sieciującego użyto metlenobisakrylamidu. Całkowite stężenie monomerów w mieszaninie do polimeryzacji wynosiło 76 mM. Zawartość kwasu akrylowego ustalono na 10% w stosunku do wszystkich monomerów. Monomer NIPA przed syntezą został

dwukrotnie rekrytalizowany w mieszaninie benzen/heksan o stosunku 9:1. Monomery rozpuszczone zostały w 6 ml wody dejonizowanej. 50 μ L DNA (oligo 1 i oligo 2) o stężeniu 100 μ mol/L rozpuszczano w 3ml w buforu fosforanowego o pH 7,4. Absorbancja roztworu wynosiła około 0,5. Sporządzony roztwór oligonukleotydów dodawano do roztworu monomerów. Całkowite stężenie DNA w roztworze monomerów wynosiło 3,34 μ mol/L. Następnie uzyskany roztwór mieszano przez godzinę w temperaturze 70 °C (było to powyżej T_m każdego z wprowadzanych oligonukleotydów) w atmosferze argonu. W celu inicjacji polimeryzacji wolnorodnikowej dodano 1 ml (10 mg/mL) nadtlenosiarczanu potasu (KPS). Zastosowano szybkie mieszanie roztworu (1400 rpm). Reakcja polimeryzacji trwała 4 h. Otrzymany roztwór nanożeli trzymano w temperaturze otoczenia przez 24 h. Analogicznie prowadzone były syntezy porównawcze z użyciem jednego oligonukleotydu (oligo1 lub oligo2).

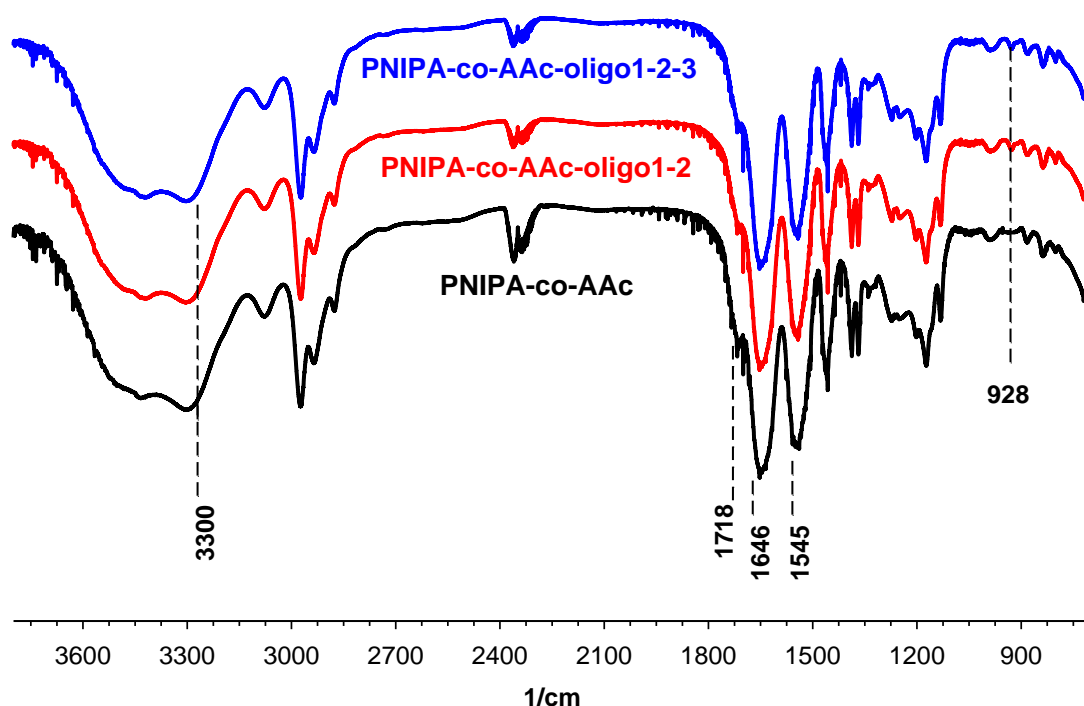
Otrzymane nanożele były oczyszczane w procesie dializy w celu usunięcia niespolimeryzowanych form oraz eliminacji wolnych odcinków nici DNA. Zawiesina nanożeli została umieszczona w błonie dializacyjnej o wielkości 8 - 10 kDa i dializowana wobec czystej wody dejonizowanej. Dializa prowadzona była aż do momentu, gdy dializat uzyskał przewodnictwo równe przewodnictwu czystej wody (0,056 mS/cm). Proces ten trwał około tygodnia przy dwukrotnej wymianie wody w ciągu dnia.

Wydatność syntezy i stężenie związanych oligonukleotydów oszacowano poprzez pomiar absorbancji przy $\lambda = 270$ nm dla roztworów nanożeli jak i również dla dializatu z pozostałościami. Do obliczeń zastosowano następujący współczynnik ekstynkcji $\epsilon_{270} = 166\,350$ L/mol cm.

Po syntezie i oczyszczaniu nanożeli przeprowadzono proces hybrydyzacji, patrz rys. 43B. W tym celu roztwór nanożeli PNIPA-AAc-oligo12 ogrzewano do 60° C (wartość bliska temperaturze T_m oligonukleotydów) w celu rozciągnięcia wprowadzonych nici i zarazem skurczenia się sieci, a przez to łatwiejszego dostępu do wprowadzonych oligonukleotydów. Nici komplementarna o stężeniu około 30% większym niż łączne stężenie nici wprowadzonych (oligo 3) podgrzano również do tej samej temperatury. Nici komplementarna została rozpuszczona w buforze PBS z zawierającym 0,15 M NaCl i 0,002 M KCl, w celu stabilizacji nowej trzysegmentowej hybrydy. Stężenie jonów zostało dobrane tak by nie powodowało kurczenia się sieci nanohydrożelu. Kolejnym etapem było zmieszanie obydwu roztworów i inkubacja w 30° C przez 2 godziny, gdzie równocześnie zachodziły procesy pęczenia i łączenia się komplementarnych zasad w DNA. Następnie roztwór schłodzono w łaźni lodowej, co zwiększyło prawdopodobieństwo zajścia hybrydyzacji. W celu ukończenia hybrydyzacji

roztwór przechowywano 24 h w niskiej temperaturze. Po procesie hybrydyzacji, aby pozbyć się niezwiązanych części DNA przeprowadzono dializę analogiczną jak po syntezie nanożelu. Suma stężeń wszystkich wprowadzonych oligonukleotydów została oszacowana spektrofotometrycznie. W celu kontrolnym łącznik oligo 3 został dodany również do nanożeli z jednym wprowadzonym oligonukleotydem (PNIPA-AAc-oligo1 i PNIPA-AAc-oligo2).

W celu potwierdzenia poprawności wykonanej syntezy wykonano badania FTIR, które potwierdziły obecność charakterystycznych drgań dla polimeru PNIPA oraz mikrodrżenia związane z wprowadzeniem oligonukleotydów (rys. 44).



Rys 44. Widmo FTIR dla nanożeli PNIPA-AAc, PNIPA-AAc-oligo12 i PNIPA-AAc-oligo123.

Analiza widma pozwoliła na stwierdzenie obecności pików przy 3300 cm^{-1} związanego z obecnością wody w strukturze polimerowej nanożelu. Odpowiada on drganiom rozciągającym grup -NH i -OH . Intensywność tego pików zależy od ilości wody związanej w polimerze. Natomiast wzrost jego intensywności w stosunku do pików monomerów jest dowodem na to, że zaszła polimeryzacja. Pozostałe pików charakterystyczne dla zsyntezowanych nanożeli to pik przy 1646 cm^{-1} i 1545 cm^{-1} odpowiadające drganiom >C=C i C=O grupy karbonylowej monomeru NIPA. Natomiast obecność grupy akrylowej potwierdza pik przy 1718 cm^{-1} związany z drganiami C=O grupy karboksylowej. W widmach nanocząstek zmodyfikowanych oligonukleotydami możemy zobaczyć również pik przy około 928 cm^{-1} , który świadczy o symetrycznych rozciągających drganiach grup fosforanowych wprowadzonych oligonukleotydów.

9.1.2. Analiza rozmiaru cząstek i potencjału zeta

Rozmiar nanocząstek będących potencjalnymi nośnikami leków ma duży wpływ na dystrybucję, wnikanie do komórek oraz późniejszą eliminację nośnika z organizmu. Wykazano, iż odpowiedni rozmiar i ładunek powierzchniowy mogą znacznie poprawić przepuszczalność nośnika przez błony komórkowe [259]. Niewielki rozmiar nanożeli powoduje również szybką reakcję na bodźce środowiskowe w porównaniu do żeli w skali makro, co jest dodatkowym atutem pod kątem uwalniania leków z tego typu nośników.

Zsyntezowane nanożele wykazywały różną dystrybucję rozmiaru w zależności od stopnia modyfikacji materiałem biologicznym. Zaobserwowałam, że dodatek jednoniciowego DNA nieznacznie zmniejszył rozmiar nanożeli w stosunku do jego niezmodyfikowanych form. Natomiast nanożele z dwuniciowymi, trzysegmentowymi formami wykazywały wyraźnie mniejszy rozmiar w stosunku do ich poprzedników. Związane było to z zacieśnianiem struktury polimerowej nanożelu w wyniku przyłączenia się komplementarnych odcinków DNA.

Rozmiar nanożeli zmieniał się wraz z temperaturą. W warunkach fizjologicznych dla nanożeli z trzysegmentową hybrydą DNA wynosił około 212 nm. Pozwala to stwierdzić, patrząc na dotychczasowe doniesienia literaturowe, że był optymalny pod kątem uzyskania nośnika leku użytecznego w organizmie ludzkim [260]. Po podwyższeniu temperatury do 45 °C rozmiar nanożeli drastycznie spadał w wyniku kurczenia się sieci polimerowej. Największy spadek rozmiaru zaobserwowałam dla nanożeli z trzysegmentową hybrydą DNA (kurczyły się do około 90 nm). Porównując uzyskane wyniki obserwowałam nieznaczny spadek rozmiaru z temperaturą dla nanożeli niezmodyfikowanych, dla nanożeli PNIPA-AAc-oligo12 był nieco większy a największy dla PNIPA-AAc-oligo123. Takie wyniki sugerują, że nanożele z trzysegmentową hybrydą DNA wykazują największą czułość na zmiany temperatury w zadanym zakresie. Uzasadnia to, zastosowanie podwyższonej temperatury (hipertermii), jako czynnika uwalniającego lek z sieci polimerowej nanożelu.

Potencjał zeta jest ważnym parametrem fizykochemicznym, gdyż wpływa na stabilność nanozawiesin. Duże wartości dodatnie lub ujemne potencjału zeta powodują większe siły odpychania, podczas gdy odpychanie pomiędzy cząstkami o podobnym ładunku elektrycznym zapobiega agregacji cząstek, a tym samym zapewnia łatwe ponowne rozproszenie. W przypadku zoptymalizowanej stabilizacji elektrostatycznej i sterycznej pożądanym jest minimalny potencjał zeta ± 20 mV [261].

Zsyntezowane przeze mnie nanożele ze względu na obecność grup $-\text{COOH}$ obdarzone były ładunkiem ujemnym. Obecność DNA w zmodyfikowanych formach nanożeli również

wpływała na stabilizację ładunku ujemnego dzięki obecności grup fosforanowych w jego szkielecie. Wszystkie zsyntezowane przeze mnie układy posiadały optymalne wartości potencjału zeta w warunkach fizjologicznych (powyżej 20 mV). W związku z tym wykazywały wysoką stabilność i możliwość wykorzystania ich, jako potencjalne nośniki leków hydrofobowych.

Poniżej przedstawiono zestawienie rozmiarów oraz potencjałów zeta omawianych nanożeli wykonanych techniką dynamicznego rozpraszania światła w 3 różnych temperaturach.

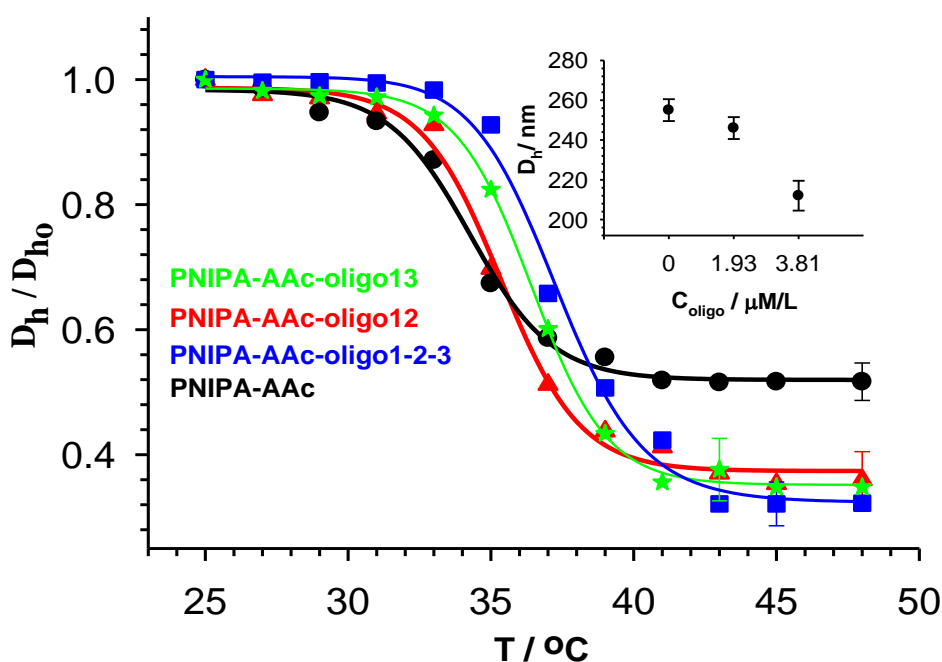
Typ nanożelu	PNIPA-AAc	PNIPA-AAc- oligo12	PNIPA-AAc- oligo123
Rozmiar w 25 °C (nm)	495,8±11,1	481,7±13,5	440,1±12,3
Rozmiar w 37 °C (nm)	255,5±8,5	246,6±7,5	212,6±6,0
Rozmiar w 45 °C (nm)	214,6±4,5	165,4±5,0	93,0±3,5
Potencjał zeta w 25 °C (mV)	-11,3±0,3	-9,9±0,5	-15,6±0,7
Potencjał zeta w 37 °C (mV)	-22,4±0,7	-24,1±0,9	-25,9±0,8
Potencjał zeta w 45 °C (mV)	-30,1±0,5	-25,5±0,4	-28,8±0,7
PDI 25 °C/37 °C/45 °C	0,21/0,11/0,10	0,25/0,18/0,16	0,28/0,15/0,13

Tabela 8. Zestawienie rozmiarów i potencjałów zeta poszczególnych rodzajów nanożeli mierzone techniką DLS. PDI (ang. polydispersity index) – stopień polidispersyjności.

9.1.3. Analiza objętościowego przejścia fazowego

Badanie wpływu temperatury na stopień spęcznienia, a co za tym idzie rozmiar nanożeli prowadziłam przy pomocy techniki dynamicznego rozpraszania światła. Dokładna analiza zmiany rozmiaru nanożeli od temperatury, mierzona za pomocą promieni hydrodynamicznych (D_h), jest przedstawiona na rysunku 45. Przedstawione zostały wartości D_h znormalizowane względem nanożeli spęczniałych w temperaturze pokojowej (25 °C) w funkcji temperatury. Wpływ temperatury był zależny od rodzaju formy DNA wprowadzonego do sieci nanożelu. Zauważyłam, że przejście fazowe pomiędzy stanem spęczniałym a skurczonym dla nanożeli zmodyfikowanych DNA zachodziło w temperaturze 37 °C, podczas gdy dla niezmodyfikowanych nanożeli PNIPA-AAc występowało w 35 °C. Przesunięcie temperatury przejścia fazowego nanożeli po modyfikacji DNA związane było z przesunięciem się

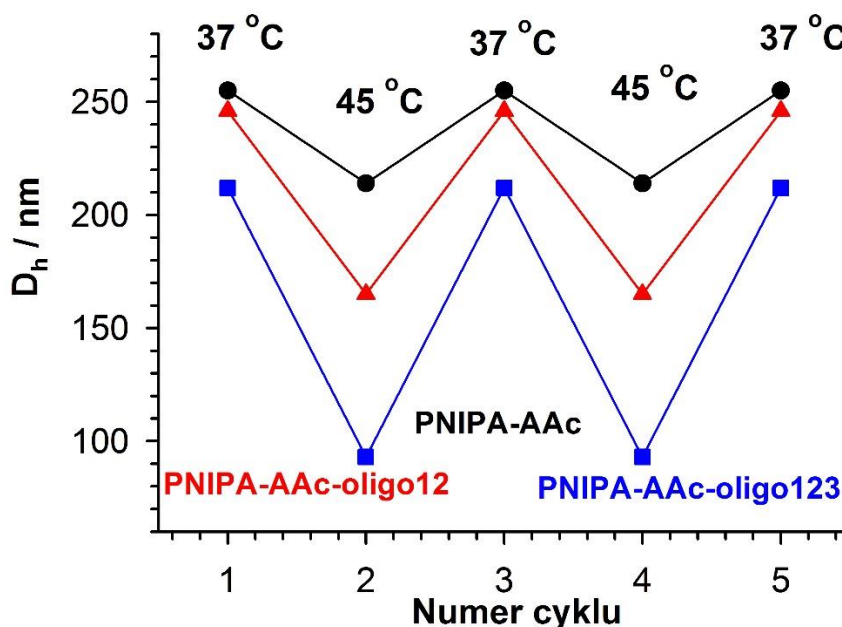
równowagi hydrofobowo - hydrofilowej sieci polimerowej, co skutkowało usunięciem wody z jej struktur. Przesunięcie takie jest korzystne z punktu widzenia zastosowania nanożeli do uwalniania substancji leczniczej w temperaturze fizjologicznej. Dla nanożeli PNIPA-AAcoligo123 kurczenie się sieci polimerowej przebiegało nieco później niż dla pozostałych nanożeli zmodyfikowanych DNA. Im wyższy był stopień hybrydyzacji, czyli im dłuższe były dwuniciowe odcinki DNA, tym nanożele ulegały skurczeniu w wyższych temperaturach. Ważne jest również, że nanożele zmodyfikowane kurczyły się finalnie do znacznie mniejszych rozmiarów niż nanożele niezmodyfikowane. Dodatkowo, w zakresie temperatur od 37 do 45 °C następowało dalsze kurczenie się nanożeli, co jest obiecujące pod kątem zwiększonego uwalniania leku w warunkach hipertermii (45 °C). Wszystkie opisane powyżej właściwości sprzyjały zastosowaniu nanożeli modyfikowanych oligonukleotydami jako czułych na temperaturę nośników leków.



Rys. 45. Znormalizowane zmiany D_h dla poszczególnych nanożeli. Rys. wstawiony: zależność rozmiaru w temp fizjologicznej od całkowitego stężenia wprowadzonego DNA w oczyszczonym roztworze/zawiesinie nanocząstek żelu.

Z kolei, na rysunku wstawionym prezentowana jest zależność rozmiaru mierzonego w warunkach temperatury fizjologicznej od stężenia wprowadzonych oligonukleotydów. Obserwujemy, że wraz ze wzrostem stężenia DNA w sieci polimerowej rozmiar nanożelu maleje. Najmniejszy rozmiar wykazywały nanożele PNIPA-AAcoligo123. Interpretowałam to jako zacieśnianie się łańcuchów sieci polimerowej po dołączeniu się trzeciej nici DNA.

Sprawdzono również czy zmiana rozmiaru nanożeli po naprzemiennym grzaniu i chłodzeniu wybranych próbek jest odtwarzalna. W tym celu próbki ogrzewano i chłodzono cyklicznie stosując temperatury 37 - 45 °C. Wyniki pomiarów przedstawione są na rysunku 46. Analizując przedstawione na rysunku dane widzimy, że każdy cykl temperaturowego grzania i chłodzenia nanożeli był odwracalny. Żele kurczyły się i wracały do swoich początkowych rozmiarów. Najszerszy zakres zmian rozmiarów występował dla nanożeli PNIPA-AAc-oligo123, kolejno dla PNIPA-AAc-oligo12 i PNIPA-AAc. Należy podkreślić, że zmiany temperatury od 37 do 45 °C dla nanożeli PNIPA-AAc-oligo123 nie powodują procesu denaturacji DNA; nie została przekroczona temperatura T_m . Mogą one jednak powodować lokalne zmiany przed denaturacyjne polegające na rozluźnianiu podwójnej nici DNA. Tego typu oddziaływania mają korzystny wpływ na uwalnianie z nanożeli zaadsorbowanego w procesie interkalacji leku.

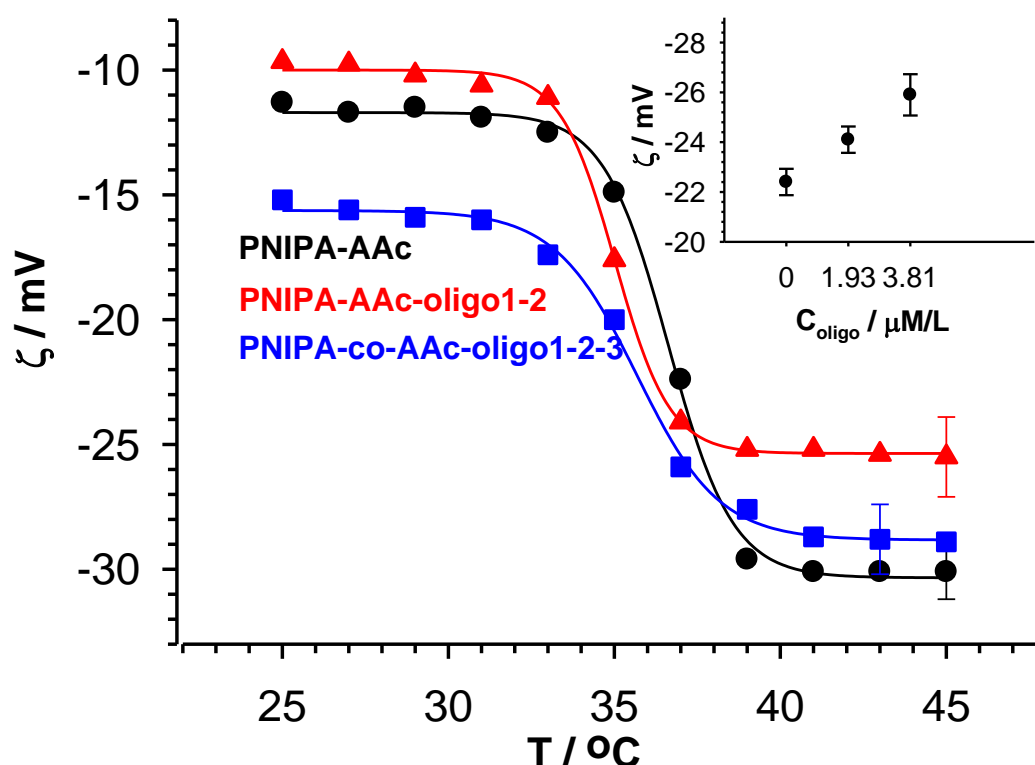


Rys 46. Zmiany promienia hydrodynamicznego D_h w cyklach grzania i chłodzenia nanożeli od temperatury fizjologicznej do 45 °C.

Przeprowadziłam również badania potencjału zeta w funkcji temperatury. Na rysunku 47 zostały przedstawione krzywe obrazujące zmiany potencjału zeta w zakresie temperatur od 25 do 45 °C. Badania te pozwoliły stwierdzić, że zmiany wartości potencjału zeta są ściśle związane ze spadkiem rozmiaru nanożeli w poszczególnych temperaturach, a więc z przejściem fazowym. Wraz ze wzrostem temperatury dla wszystkich badanych nanożeli potencjał zeta przyjmował wartości bardziej ujemne. Natomiast dla nanożeli PNIPA-AAc-oligo123 występował najmniejszy zakres zmian potencjału zeta od temperatury. Sugeruje to, że są one najbardziej odporne na zmianę warunków środowiska. Należy podkreślić, że wszystkie

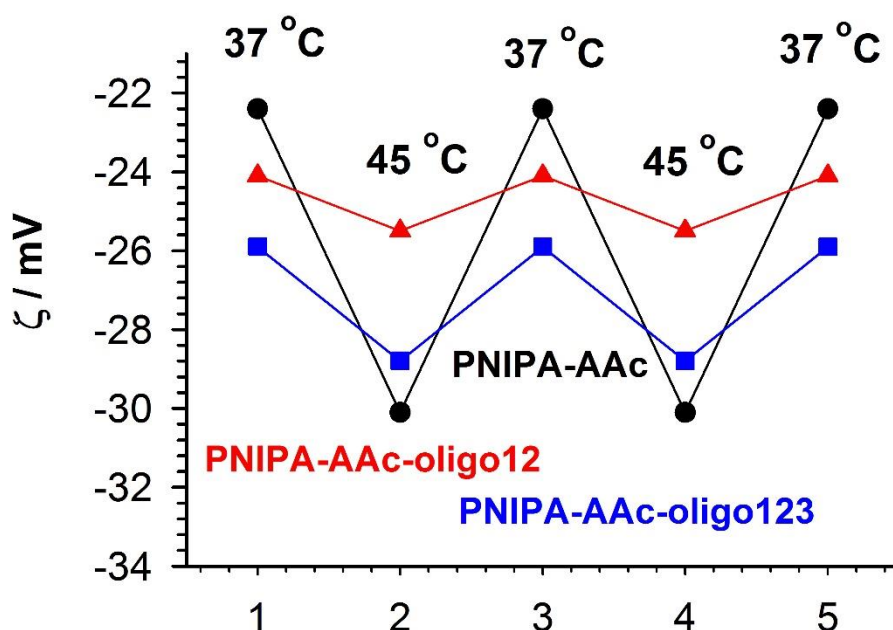
nanożele w zadanych temperaturach posiadają optymalny zakres potencjału zeta (powyżej 20 mV).

Na rysunku wstawionym do rys. 47 została przedstawiona zależność pomiędzy potencjałem zeta a stężeniem oligonukleotydów zawartych w nanożelach. Widzimy, że wraz ze wzrostem stężenia DNA następuje wzrost (w kierunku bardziej ujemnych wartości) potencjału zeta. Związane jest to ze zwiększoną ilością ujemnie naładowanych grup fosforanowych w szkielecie DNA.



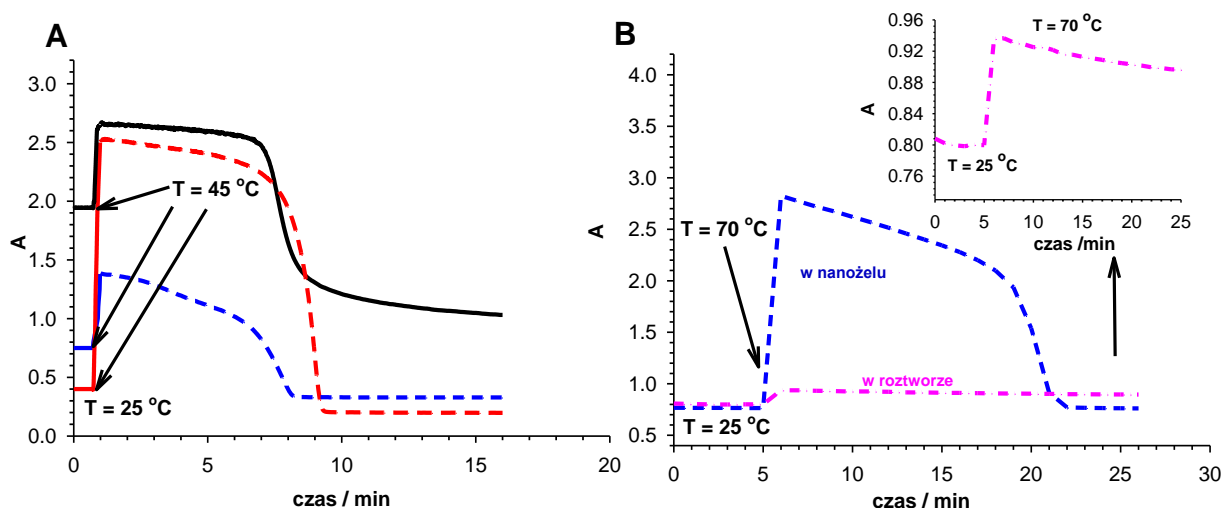
Rys. 47. Zmiany potencjału zeta w funkcji temperatury dla poszczególnych typów nanożeli. Rysunek wstawiony: zależność potencjału zeta w warunkach fizjologicznych od stężenia wprowadzonego DNA.

Zbadałam również czy zmiany potencjału zeta w cyklach grzania i chłodzenia nanożeli będą miały charakter odwracalny. Na rysunku 48 zestawione są wartości potencjałów zeta dla cykli temperaturowych 37 – 45 °C. Zmiany potencjału zeta po skurczeniu i spęcznieniu nanożeli były odwracalne dla wszystkich typów nanożeli. Dla nanożeli zmodyfikowanych DNA zakres zmian potencjału zeta był znacznie mniejszy niż dla nanożeli niezmodyfikowanych. Dla nanożeli z wprowadzonymi oligonukleotydami obserwujemy mniejsze zmiany potencjału zeta w zakresie badanych temperatur, co świadczy o stabilności struktury nanożeli w tych warunkach.



Rys. 48. Zmiany potencjału zeta w cyklach grzania i chłodzenia nanożeli od temperatury fizjologicznej do temperatury 45 °C.

Kolejnym etapem było zbadanie zmian absorbancji nanożeli przy $\lambda = 260$ nm po nagłych zmianach temperatury. Na rysunku 49A zostały przedstawione zmiany absorbancji w funkcji czasu po dodaniu równo objętościowych ilości gorącej wody do danej próbki nanożelu. Obserwowałam szybki wzrost absorbancji spowodowany kurczeniem się nanożelu, a co za tym idzie mętnieniem i utratą przejrzystości próbki. Zaobserwowałam, że po pewnym czasie próbki wracały do początkowego stanu; faktyczna absorbancja była o połowę niższa, ponieważ następowało rozcieńczenie roztworu. Zakres czasu, w którym następował proces rozkurczania się był inny dla poszczególnych typów nanożeli. Proces pęcznienia i powrotu do wartości początkowej nastąpił po 10 minutach dla nanocząstek PNIPA-AAc i PNIPA-AAc-oligo12 oraz po 8 minutach dla nanocząstek NPP PNIPA-AAc-oligo123. Obecność trzysegmentowej hybrydy w nanożelu PNIPA-AAc-oligo123 spowodowała szybszą przemianę fazową ze stanu skurczonego do stanu rozpęczniałego. Dane te nie pozwalają jednak na dokładną ocenę zmian, jakie zaszły w strukturze DNA. W uzyskanym zakresie temperatur możliwe było lokalne rozplatanie nici DNA. Natomiast powrót absorbancji do stanu początkowego sugeruje, że jeśli zaszły jakieś zmiany struktury podwójnej nici DNA to były one odwracalne.



Rys.49 (A) Zmiany absorbancji w czasie dla nanożeli po podgrzaniu do 45° C. (B) Zmiany absorbancji trzysegmentowej hybrydy DNA w temperaturze 70° C w nanożelu i w roztworze.

Aby ocenić jak zachowuje się trzysegmentowa hybryda DNA wbudowana w nanożel po zastosowaniu wysokiej temperatury (powyżej temperatury topnienia oligonukleotydów tj. 70 °C) przeprowadzono specjalny eksperyment. Wyniki jego zostały przedstawione na rysunku 49B. Roztwory były podgrzewane do zadanej temperatury bez ich rozcieńczania. Dla porównania, proces ten został przeprowadzony dla takiej samej hybrydy DNA jednak utworzonej w roztworze. Wyniki sugerują, że w żelu może następować regeneracja dwuniciowej formy hybrydy, gdyż następuje nagły wzrost absorbancji. Jednak po pewnym czasie wraca ona do stanu początkowego. Inaczej jest w roztworze gdzie po podgrzaniu do 70° C absorbancja nie wraca do stanu początkowego tylko przyjmuje wyższe wartości. Wyniki tych pomiarów w nanożelach były powtarzalne w kolejnych cyklach ogrzewania i chłodzenia.

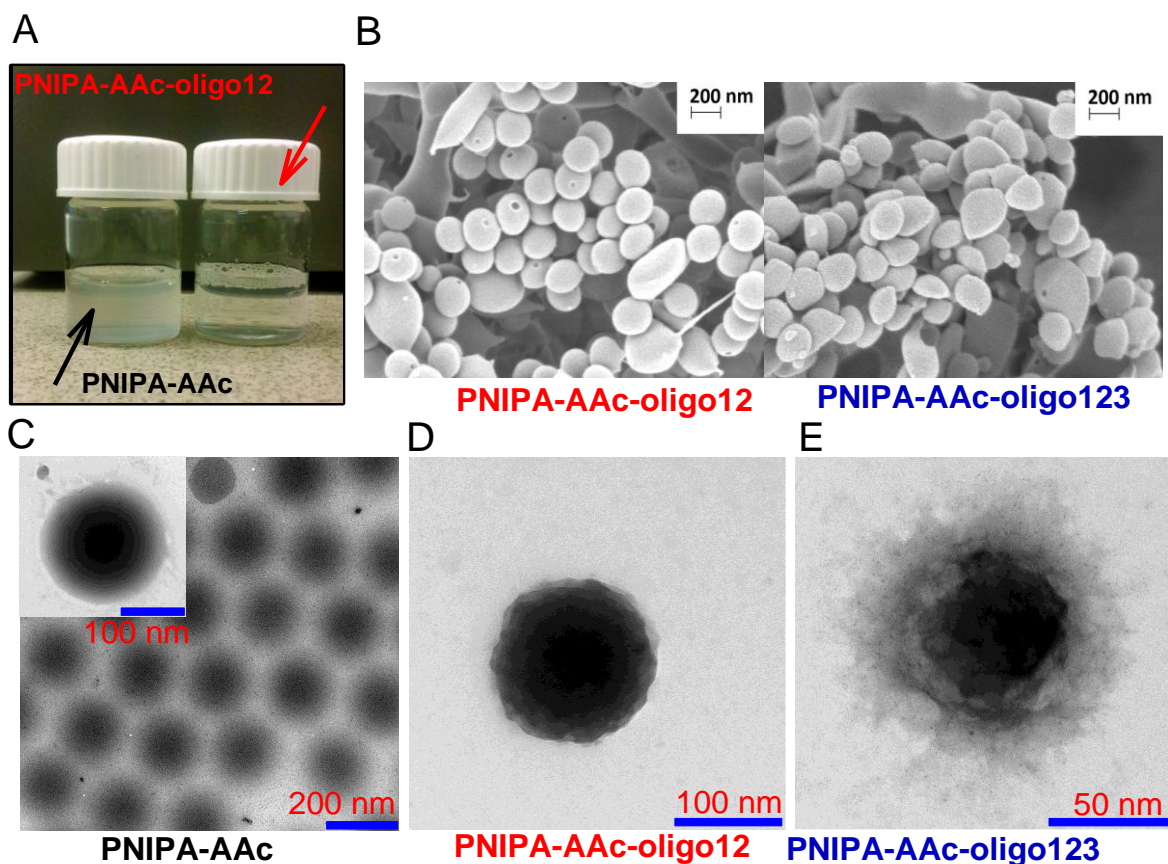
Powyższe wyniki pozwalają dojść do wniosków, że podczas podgrzewania nanożeli nie zachodzą nieodwracalne zmiany w strukturze DNA. Mogą występować jedynie lokalne zmiany przeddenaturacyjne pozwalające na rozluźnienie nici, a co za tym idzie łatwiejsze uwolnienie zakumulowanego w niej leku.

9.1.4. Morfologia

Kolejnym etapem badań było porównanie morfologii zsyntezowanych nanomateriałów. Zmiany po modyfikacji oligonukleotydami były widoczne tuż po syntezie poprzez obserwację wzrokową. Nanożele zmodyfikowane oligonukleotydami wykazywały większą transparentność w stosunku do nanożeli niezamodyfikowanych. Zmniejszenie zmętnienia roztworów nanożeli z wprowadzonymi odcinkami DNA spowodowane było zwiększoną akumulacją wody w sieci polimerowej, co możemy zaobserwować na rysunku nr 50A.

Aby uzyskać dokładny obraz analizowanych obiektów zastosowałam skaningową mikroskopię elektronową. Na rysunku 50B można zobaczyć zdjęcia SEM nanosystemów z pojedynczymi oraz podwójnymi niciami DNA. Próbkę oglądano po delikatnej liofilizacji oraz napyleniu stopem pallad/złoto. Kształty analizowanych nanożeli są podobne. Jednak nanocząstki PNIPA-AAcoligo12 wydają się być bardziej kuliste i jednorodne w porównaniu z nanocząstkami PNIPA-AAcoligo123. Związane może być to z tym, iż kształt nanożeli nieznacznie się zmienia po procesie hybrydyzacji i wprowadzeniu nici komplementarnej. Drugim ważnym parametrem, który możemy oszacować ze zdjęć jest rozmiar nanożeli. Pokrywa się on z rozmiarem mierzonym techniką DLS. Zakładamy jednak, że obrazowane nanożele znajdują się w stanie częściowo spęczniałym w związku z metodą liofilizacji, która powoduje, że część skryształizowanych cząsteczek wody jest nadal obecna w nanożelu.

Więcej szczegółów na temat struktury wewnętrznej nanożeli uzyskano analizując mikrogramy transmisyjnej mikroskopii elektronowej, patrz rys. 50C-50E. Ze względu na proces przygotowywania próbek polegający na suszeniu ich w temperaturze 50 °C, a przez co znacznie niższą zawartość wody niż w próbkach liofilizowanych, rozmiary nanożeli w technice TEM ukazywały stan skurczony. Próbkę przygotowywane były na siatkach poprzez nakrapianie i suszenie, a następnie były kontrastowane poprzez naniesienie 1% roztworu octanu uranylu. Udowodnione jest, że jony UO^{2+} dobrze oddziałują z grupami $-COOH$ obecnymi w sieci nanożelu jak i z grupami fosforanowymi kwasów nukleinowych. Na zdjęciach TEM widzimy, że nanocząstki zmodyfikowane DNA są bardziej skonstrastowane (ciemniejsze), co świadczy o większej akumulacji jonów uranylu w stosunku do nanożeli niezmodyfikowanych. Można zauważyć również, że nanocząstki PNIPA-AAc mają znacznie gładszą powierzchnię niż nanocząstki zmodyfikowane oligonukleotydami. Obecność pojedynczych nici DNA gwarantowała równomierne rozmieszczenie jonów uranylu w nanożelu (rys. 50D). Jednak po dołączeniu nici komplementarnej dystrybucja DNA ulegała rozproszeniu i tworzeniu dwuniciowej struktury w powierzchniowej warstwie nanocząstki. Nastąpiło również tworzenie się otoczki hydratacyjnej związanej z obecnością wiązań wodorowych powstałych w skutek utworzenia podwójnej nici DNA.

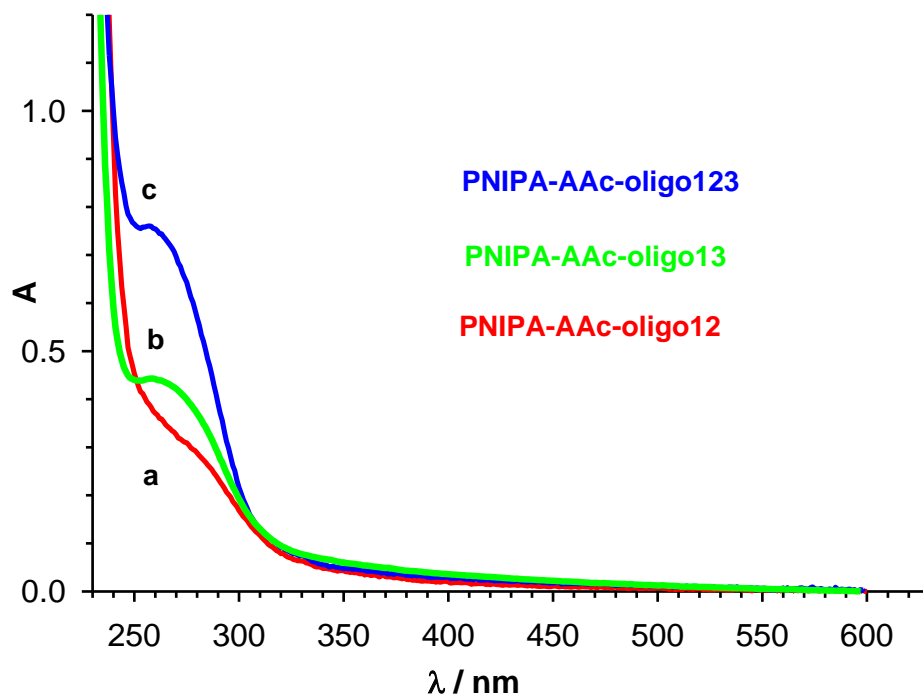


Rys. 50. (A) Porównanie wyglądu nanożeli PNIPA-AAc i nanożeli PNIPA-AAc z unieruchomionymi odcinkami nici oligo1 i oligo2, $T = 25^{\circ} \text{C}$. (B) Mikrografy SEM nanocząstek PNIPA-AAc-oligo12 i PNIPA-AAc-oligo123, uzyskane po łagodnej liofilizacji roztworu nanożeli. (C) Mikrografy TEM nanocząstek PNIPA-AAc. (D, E) Mikrografy TEM PNIPA-AAc-oligo12 i PNIPA-AAc-oligo123.

9.1.5. Analiza procesu hybrydyzacji i wprowadzenia nici DNA

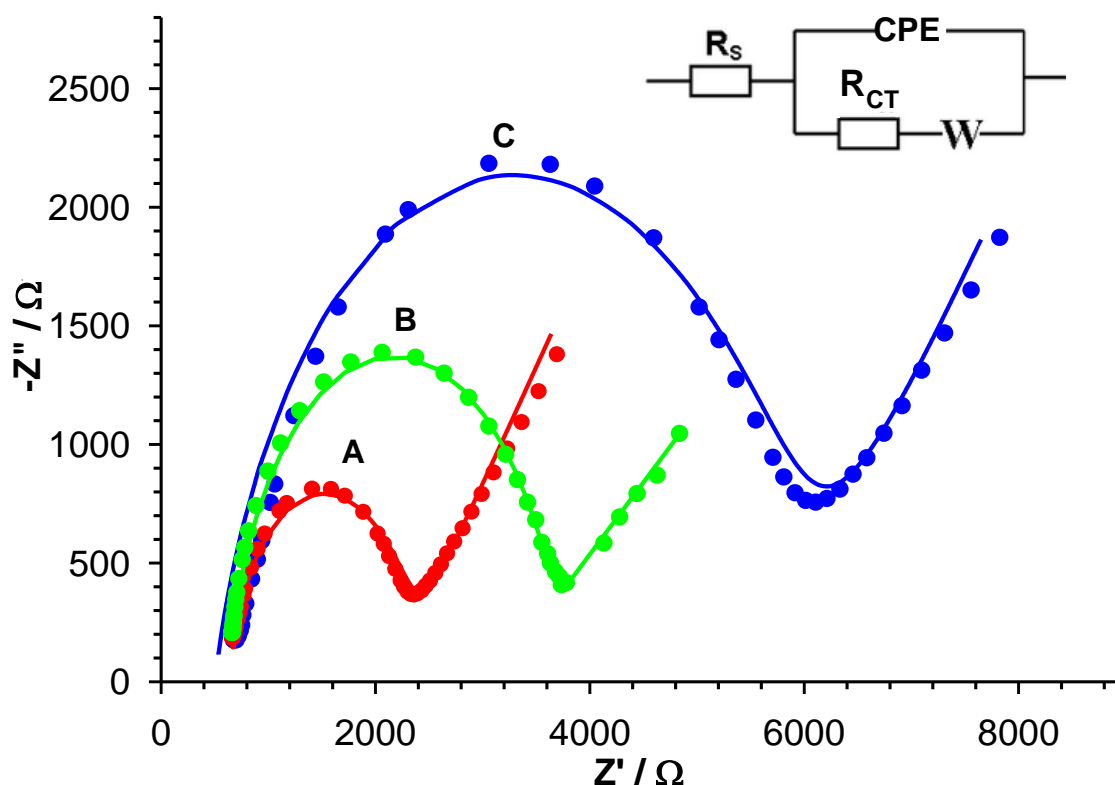
Zmiany zachodzące podczas procesu hybrydyzacji były monitorowane w nanożelach za pomocą spektroskopii UV-Vis.

Na rysunku 51 widzimy widma UV-Vis dwóch typów hybrydyzacji w zestawieniu z absorbancją pojedynczych nici oligo 1 i 2 wprowadzonych do nanożelu. Możemy zauważyć, że wprowadzenie trzeciej nici komplementarnej do obu nici wprowadzonych do nanożelu spowodowało dwukrotny wzrost pasma absorpcji DNA (kolor niebieski). Natomiast w przypadku standardowej hybrydyzacji 1: 1, gdzie do jednej nici wprowadzonej do nanożelu dołączono nić 3, nastąpił tylko nieznaczny wzrost wielkości pasma absorpcji.



Rys 51. Widmo UV- Vis oligonukleotydów wprowadzonych do nanożelu PNIPAAc.

Aby udowodnić, że hybrydyzacja trzysegmentowa zachodzi i znacząco różni się od zwykłego typu hybrydyzacji przeprowadzono badania za pomocą elektrochemicznej spektroskopii impedancyjnej (EIS). Metoda ta jest szeroko stosowana do analizy procesu hybrydyzacji jednoniciowych oligonukleotydów. Aby określić parametry EIS dla nanożeli zmodyfikowanych DNA nakropiono kilka warstw nanożeli na elektrodę z węgla szklatego. Następnie wykonano pomiary i otrzymano krzywe Nyquista oraz wyznaczono parametry pojemnościowe i przewodnictwa charakteryzujące daną warstwę. Jako próbnika redox użyto roztworu równomolowego żelazo- i żelazicyjanków ($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4}$). Na rysunku 52 przedstawione zostały widma EIS wykonane dla trzech typów modyfikacji nanożeli molekułą DNA: zmodyfikowanych pojedynczymi nićmi DNA, zmodyfikowanych nićmi zhybrydyzowanymi 1: 1 oraz zmodyfikowanych nićmi z hybrydyzacją trzysegmentową.



Rys 52. Widma EIS dla (A) PNIPA-AAc-oligo12, (B) PNIPA-AAc-oligo13, (D) PNIPA-AAc-oligo123. Obwód elektryczny przedstawiony na rysunku to obwód zastępczy Ershlera-Randlesa.

Na powyższym rysunku przedstawiono wykresy Nyquista. Wszystkie wykresy zawierają półokrąg i element liniowy. Średnica półokręgu na wykresach jest miarą oporu przeniesienia elektronu w układzie redox. W przypadku warstw nanożelowych, które mają dobry kontakt z powierzchnią elektrody, powinno nastąpić zmniejszenie pojemności podwójnej warstwy i zwiększenie bariery dla przeniesienia elektronów. Zmiany wartości oporu przeniesienia elektronu (R_{CT}) są tutaj bezpośrednio związane z długością zhybrydyzowanych odcinków DNA. Można zauważyć, że dla nanocząstek gdzie mamy hybrydyzację trzysegmentową średnica półkola na wykresie Nyquista jest największa dla hybrydyzacji trzysegmentowej (PNIPA-AAc-oligo123) i kolejno maleje dla przypadku gdzie hybrydyzacja zachodziła tylko z jednej strony nici wprowadzonej (PNIPA-AAc-oligo13). Najmniejszy opór przeniesienia elektronu rejestrowany był dla nanocząstki z pojedynczymi nićmi DNA (PNIPA-AAc-oligo12). Zmiany wartości oporu przeniesienia elektronu były bezpośrednio związane z długością zhybrydyzowanych odcinków DNA. R_{CT} rósł wraz z długością podwójnej nici DNA. Najwyższa wartość oporu przeniesienia elektronu dla hybrydy trzysegmentowej, tj. najdłuższego dwuniciowego odcinka DNA, może być interpretowana jako wzrost odpychania

elektrostatycznego pomiędzy próbnikiem redoks, a zwiększoną ilością ujemnie naładowanych grup fosforanowych w trzysegmentowej hybrydzie DNA.

Aby wyznaczyć dokładnie parametry EIS, dopasowano do wyników impedancyjnych obwód zastępczy Ershlera-Randlesa, jest on rozrysowany na rysunku 52. W tym obwodzie pojemność podwójnej warstwy elektrycznej zastąpiona jest przez element stałofazowy, CPE. Impedancja parametru CPE dana jest wzorem:

$$Z_{CPE} = T^{-1}(j\omega)^{-\phi} \quad (15)$$

gdzie: ω jest częstotliwością kątową, $j = (-1)^{1/2}$, T jest współczynnikiem pojemnościowym, ϕ jest wartością wykładnika potęgi.

Średnia pojemność warstwy podwójnej, C_{dl} , jest związana ze współczynnikiem pojemności T i może być obliczona z równania:

$$T = C_{dl}^{\phi} (R_s^{-1} R_{CT}^{-1})^{1-\phi} \quad (16)$$

gdzie: R_s i R_{CT} są wartościami oporności roztworu oraz oporności przeniesienia ładunku.

Zakładając nieskończoną dyfuzję obu form jednoelektronowego układu redoks $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$, opór przeniesienia masy (impedancja Warburga), widoczny na wykresach EIS jako część liniowa, można oszacować na podstawie równania:

$$W = \sigma \omega^{1/2} (1 - j) \quad (17)$$

gdzie: parametr Warburga σ jest opisany następującym równaniem:

$$\sigma = \frac{RT}{n^2 F^2 \sqrt{2}} \left[\frac{1}{\sqrt{D_o}} \frac{1}{C_o} + \frac{1}{\sqrt{D_R}} \frac{1}{C_R} \right] \quad (18)$$

D_o i C_o oznaczają odpowiednio współczynnik dyfuzji i stężenie dla formy utlenionej, natomiast D_R i C_R to współczynnik dyfuzji i stężenie formy zredukowanej.

Stałą szybkości przeniesienia elektronu, k_0 , można wyznaczyć za pomocą równania:

$$k_0 = \left(\frac{\sigma}{R_{CT}} \right) / \frac{2\xi^{\alpha}}{2D_{ox}} \quad (19)$$

gdzie:

k_0 jest stałą szybkości transferu elektronów, $\xi = (\sqrt{D_{ox}/D_{Red}})$, α jest współczynnikiem przeniesienia elektronu (wynosi 0,5), D_{ox} jest współczynnikiem dyfuzji $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$.

Przyjmuje się że, współczynnik dyfuzji $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ w roztworach wodnych równa się $0,896 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, natomiast w żelu PNIPA jest mniejszy o 19% i wynosi $0,726 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ oraz że $\xi = 1$.

Przy użyciu powyższych wzorów uzyskano wyniki parametrów elektrycznych dopasowanych do obwodu Ershlera-Randlesa, zebrano je w tabeli 9.

	PNIPA-AAc- oligo12	PNIPA-AAc- oligo13	PNIPA-AAc- oligo123
R_s (Ω)	309±5,2	312±4,1	305±3,7
R_{CT} (Ω)	2614±12,4	5843±10,7	7543±13,1
C_{dl} (μF)	0,799±	0,497±	0,393±
Φ	0,799±	0,822±	0,834±
σ (Ωrad^{1/2}s^{-1/2}cm²)	80,4±0,7	78,2±0,4	83,1±0,5

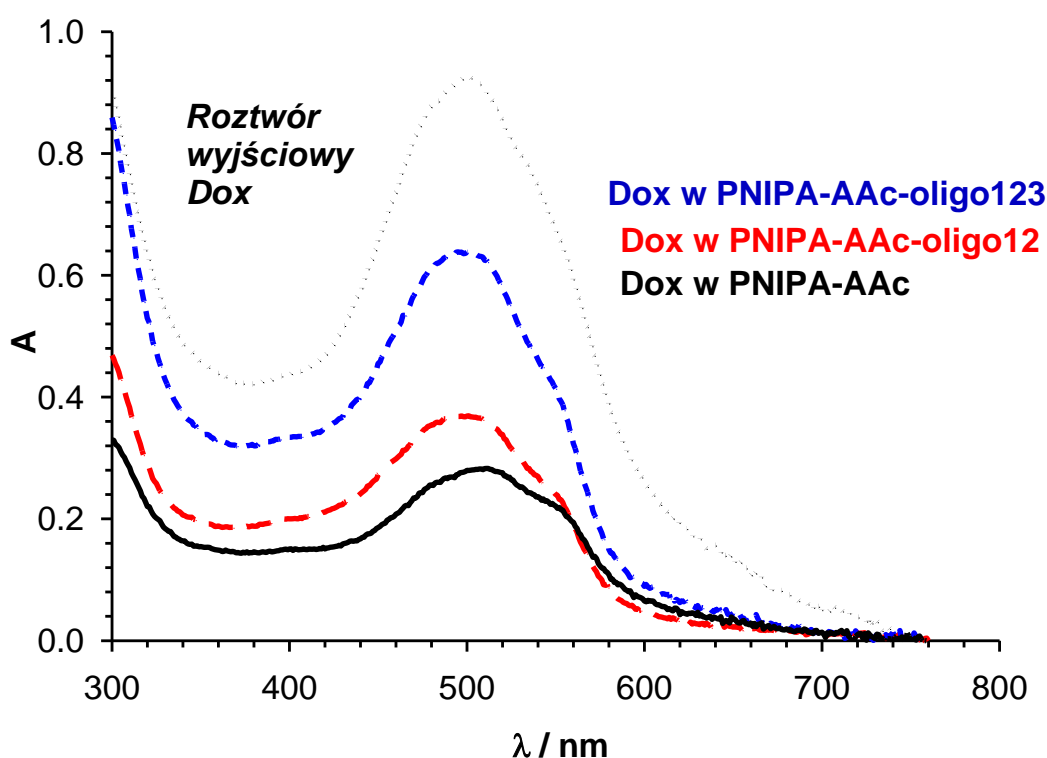
Tabela 9. Zestawienie wartości parametrów elektrycznych dopasowanych do obwodu Erschlera-Randlesa dla poszczególnych rodzajów syntezowanych nanożeli o różnych długościach podwójnej nici DNA.

Zgodnie z oczekiwaniami, oporność roztworu R_s ma podobne wartości dla wszystkich pomiarów niezależnie od długości odcinka DNA ulegającego procesowi hybrydyzacji. Ważne jest również to, że transport próbnika redox do elektrody przebiega bez utrudnień we wszystkich warstwach, co wynika z praktycznie stałej wartości parametru Warburga. Pojemność warstwy podwójnej maleje wraz ze zwiększającą się długością podwójnej nici DNA. Parametr Φ jest mniejszy niż 1, podczas gdy dla elektrod monokrystalicznych lub ciekłych o zachowaniu czysto pojemnościowym jest równy 1.

9.1.6. Badanie akumulacji i oddziaływań lek-DNA

Kolejnym etapem moich badań była akumulacja leku przeciwnowotworowego - doksorubicyny do zsintezowanych nanożeli. Doksorubicyna jako interkalator wchodzi pomiędzy pary zasad w podwójnej helisie DNA, jak również posiada duże powinowactwo do elektrostatycznego oddziaływania z parami GC w pojedynczych niciach DNA.

Na rysunku 53 możemy porównać ilości zakumulowanej doksorubicyny dla trzech rodzajów zsintezowanych nanożeli. Absorbancja doksorubicyny przy $\lambda = 485$ nm była mierzona bezpośrednio w roztworach nanożeli po odwirowaniu niezakumulowanej ilości leku.



Rys. 53. Absorbancja doksorubicyny zakumulowanej w poszczególnych nanożelach mierzona za pomocą techniki UV-Vis przy $\lambda = 485$ nm.

Można zauważyć, że największą efektywność akumulacji zarejestrowano dla PNIPA-AAc-oligo123 (67,6% roztworu wyjściowego). PNIPA-AAc-oligo12 zakumulowała 40,3%, a niezmodyfikowane nanosystemy PNIPA tylko 30,2% wyjściowego stężenia. Zgodnie z założeniami największa ilość leku została zakumulowana w nanożelach PNIPA-AAc-oligo123. Do nanożeli z pojedynczymi nićmi DNA zakumulowało się więcej leku niż do czystych nanożeli PNIPA. Związane było to z oddziaływaniem elektrostatycznym leku z pojedynczymi nićmi DNA. Należy podkreślić, że czyste nanożele PNIPA-AAc również w niewielkim stopniu zatrzymywały lek w swojej strukturze dzięki obecności ujemnie naładowanego ładunku pochodzącego od grup $-\text{COOH}$ wchodzących w skład sieci polimerowej.

Aby zbadać, jaki typ interakcji występował pomiędzy lekiem a DNA wbudowanym w nanożele (PNIPA-AAc-oligo12 i PNIPA-AAc-oligo123) wykorzystano model McGhee and von Hippel'a. Opis tego modelu znajduje się w rozdziale 8.1.4 (równanie 13).

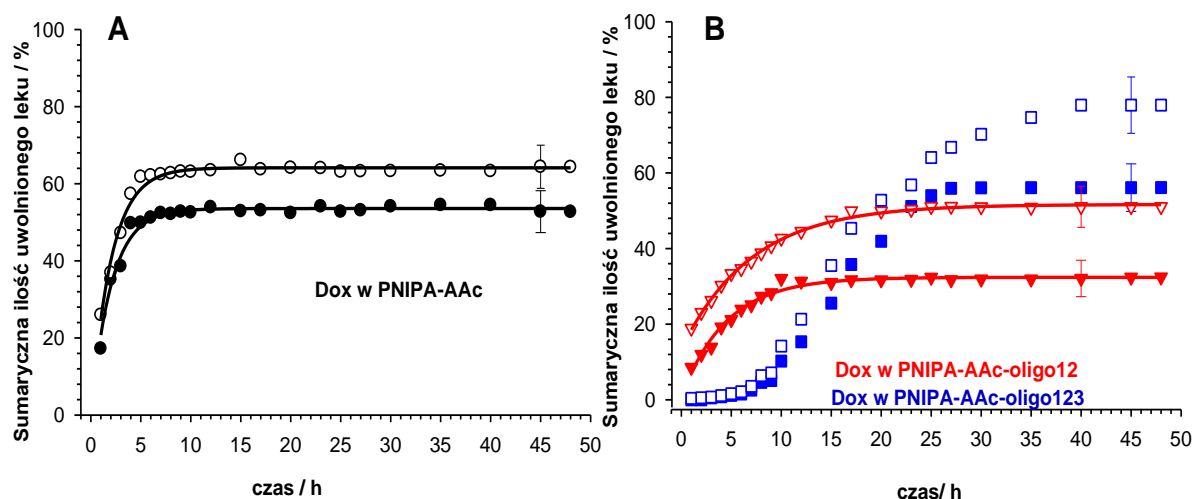
Wyniki uzyskano miareczkując doksorubicyną nanożele z określonym stężeniem DNA zawartym w sieci. Badano dwa typy nanożeli: z pojedynczymi oraz podwójnymi nićmi. Stała oddziaływania elektrostatycznego (K_2) oraz współczynnik n_2 dla ssDNA wprowadzonego do nanożelu PNIPA-AAc-oligo12 wyniosły następująco: $K_2 = 0,10 \pm 0,01 \cdot 10^5$ i $n_2 = 5,35 \pm 0,15$. W przypadku nanożeli PNIPA-AAc-oligo123, gdzie występowały dwa typy oddziaływań:

interkalacja K_1 i oddziaływania elektrostatyczne K_2 , stałe oddziaływania i liczba miejsc wiążących ligand n_1 i n_2 wyniosły kolejno: $K_1 = 1,08 \pm 0,02 \cdot 10^5$, $n_1 = 1,88 \pm 0,05$ i $K_2 = 0,168 \pm 0,003 \cdot 10^5$, $n_2 = 4,69 \pm 0,09$. Znacznie wyższe były wartości stałej oddziaływania K_1 , co sugeruje, że preferowana była interkalacja leku pomiędzy pary zasad DNA wbudowanego w sieć polimerową nanożelu PNIPA-AAc-oligo123.

9.1.7. Badania in vitro uwalniania leku z nanożeli

Badania uwalniania dokсорubicyny z nanożeli przeprowadzono w dwóch temperaturach fizjologicznej 37 °C oraz temperaturze niskiej hipertermii stosowanej miejscowo w terapii przeciwnowotworowej 45 °C. Uwalnianie prowadzone było w pH = 5,5 charakterystycznym dla komórek nowotworowych. Ilości uwalnianej dokсорubicyny zostały oznaczone przez pomiar absorbancji Dox przy $\lambda = 485$ nm w układzie przepływowym. Wyniki zostały przedstawione na wykresach 54A i 54B. Na rysunku 54A widzimy profile uwalniania leku dla nanożeli niezmodyfikowanych. Całkowita ilość uwolnionej substancji z tego typu matryc wynosiła w warunkach fizjologicznych 40%. Natomiast w warunkach hipertermicznych wynosiła około 60% w stosunku do ilości zakumulowanej. Profile uwalniania leku z niezmodyfikowanych nanożeli przyjęły standardowy kształt, a podwyższenie temperatury wpłynęło raczej nieznacznie na ilość uwalnianego leku.

Na rysunku 54B przedstawiono profile uwalniania dla nanożeli zmodyfikowanych oligonukleotydami. W tym wypadku w podwyższonej temperaturze uwolniła się sumarycznie większa ilość leku. Maksymalna ilość uwolnionego leku wynosiła 60% dla PNIPA-AAcoligo12 i 80% dla PNIPA-AAc-oligo123, w stosunku do ilości zakumulowanej. Ciekawym efektem była zmiana profilu uwalniania dla nanocząstek z wprowadzoną trzysegmentową hybrydą DNA. Początkowy proces uwalniania leku był zdecydowanie wolniejszy niż w pozostałych przypadkach, jednak ostateczna wydajność uwalniania dokсорubicyny była wyższa. Tego typu profil uwalniania jest bardzo obiecujący z punktu widzenia wykorzystania nanożeli PNIPA-AAc-oligo123 jako nośników leków o przedłużonym czasie uwalniania. Początkowe wolne uwalnianie leku może być preferowane w doiniekcyjnym podawaniu substancji leczniczych.



Rys. 54. Profile uwalniania doksorubicyny w czasie: (A) z czystych niezmodyfikowanych nośników PNIPAAc (B) z nanożeli zmodyfikowanych DNA. Temperatura 37 °C (wypełnione symbole) i temperatura 45 °C (puste symbole).

Kinetykę uwalniania doksorubicyny z poszczególnych badanych nanożeli przeanalizowano za pomocą empirycznego modelu Korsmeyera – Peppasa’a opisanego w rozdziale 8.1.4. równaniem 14.

W modelu tym dla nośników o kulistym kształcie parametr n uzyskuje odpowiednie wartości dla różnych typów transportu, zgodnie z poniższą tabelą:[262]

Typ transportu	Wartość współczynnika n
wolna dyfuzja Ficka	$n < 0,43$
dyfuzja Ficka	$n = 0,43$
dyfuzja anormalna niezgodna z prawem Ficka (ang. <i>anormalus transport</i>)	$0,43 < n < 0,85$
transport zerowego rzędu (ang. <i>case II transport, zero order drug release</i>)	$n = 0,85$
super transport kontrolowany erozją nośnika (ang. <i>super case II, erosion-controlled drug release</i>)	$n > 0,85$

Tabela 10. Typy transportu według, modelu Korsmeyera – Peppasa.

Na podstawie powyższego modelu wykreślono krzywe M_t/M_f w danych przedziałach czasowych, a wyniki zebrano w tabeli 11.

Rodzaj nanożelu	Parametry uwalniania Dox		
	<i>k</i>	<i>n</i>	<i>r</i>
0-5 godzin (37 °C/45 °C)			
PNIPA-AAc	0,46±0,01/0,38±0,01	0,46±0,02/0,35±0,02	0,998/0,998
PNIPA-AAc-oligo12	0,51±0,02/0,26±0,01	0,70±0,04/0,35±0,02	0,995/0,993
PNIPA-AAc-oligo123	0,97±0,03/0,65±0,02	1,35±0,07/0,90±0,05	0,996/0,996
6-12 godzin (37 °C/45 °C)			
PNIPA-AAc	-	-	-
PNIPA-AAc-oligo12	0,46±0,07/0,39±0,08	0,45±0,07/0,38±0,09	0,975/0,979
PNIPA-AAc-oligo123	3,06±0,10/3,05±0,20	3,29±0,19/3,28±0,20	0,997/0,993
13-25 godzin (37 °C/45 °C)			
PNIPA-AAc	-	-	-
PNIPA-AAc-oligo12	-	-	-
PNIPA-AAc-oligo123	1,90±0,20/2,21±0,10	1,04±0,17/1,60±0,08	0,988/0,996
26-48 godzin (37 °C/45 °C)			
PNIPA-AAc	-	-	-
PNIPA-AAc-oligo12	-	-	-
PNIPA-AAc-oligo123	-/0,42±0,03	-/0,25±0,02	-/0,987

Tabela 11. Dopasowane parametry modelu Peppas'a do danych eksperymentalnych uwalniania leku z nanożeli, *r*-współczynnik dopasowania do modelu (0 - 1).

Analizując przedstawione powyżej dane możemy zauważyć, że dla niezmodyfikowanych nanożeli PNIPA-AAc uwalnianie leku odbywa się zgodnie z dyfuzją Ficka. Natomiast dla nanożeli PNIPA-AAc-oligo12 w zależności od temperatury występuje uwalnianie dyfuzyjne bądź transport anormalny związany z dyfuzją i pęcznieniem polimeru jednocześnie. Całkowicie odmienne wyniki uzyskano natomiast dla nanożelu PNIPA-AAc-oligo123, gdzie wartości parametru *n* znacznie przekraczały wartość 1, co świadczy o całkiem odmiennej kinetyce uwalniania zgodnie z mechanizmem super transportu (ang. *super case II transport*), który jest bezpośrednio związany z dyfuzją oraz pęcznieniem/kurczeniem lub erozją polimeru jednocześnie.

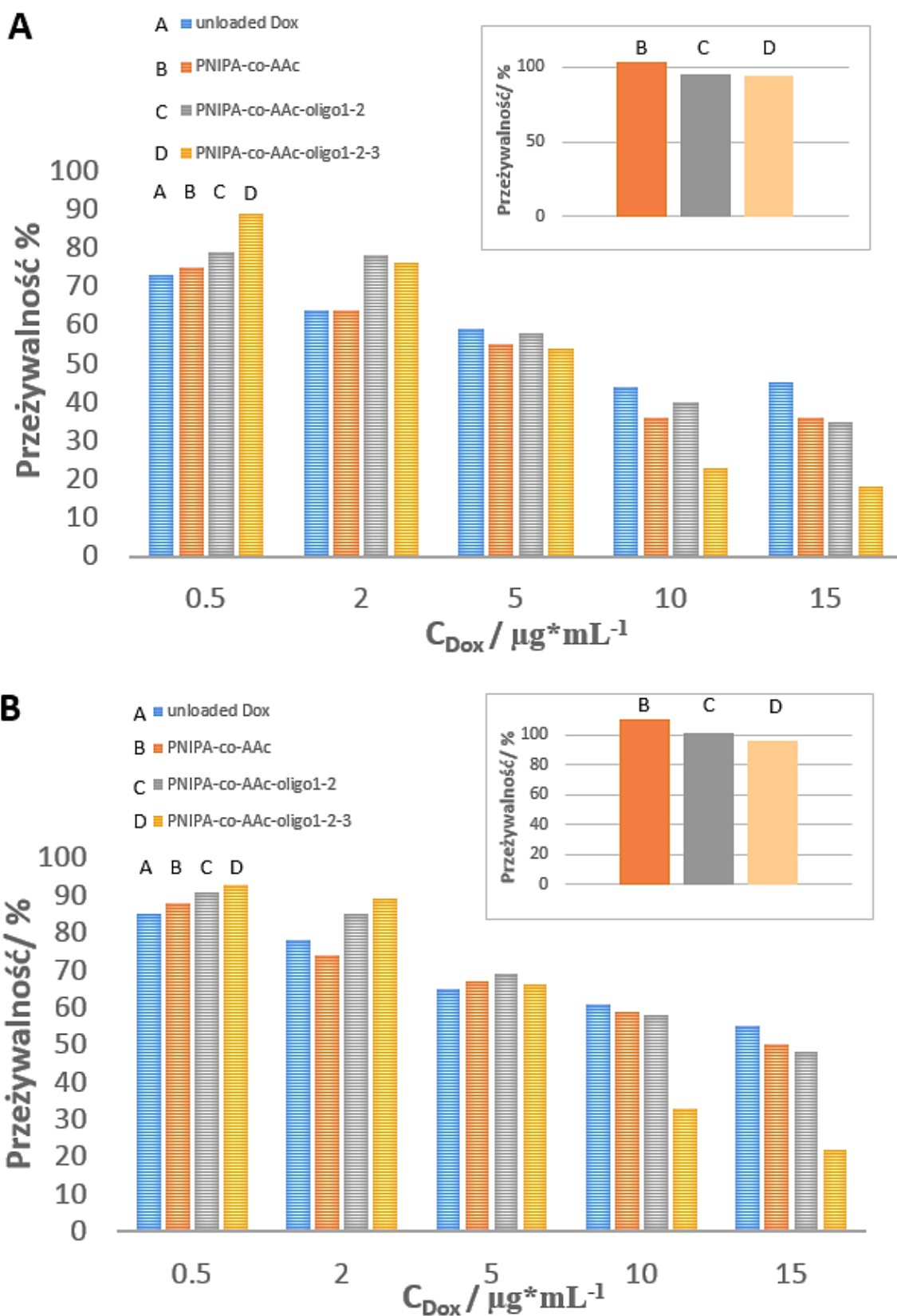
9.1.8. Badania komórkowe - test cytotoksyczności MTT

Badanie cytotoksyczności oraz biokompatybilności nanożeli było ostatnim krokiem w ocenie ich przydatności jako nanosystemów do dostarczania leków. Cytotoksyczność badanych nanożeli tj. PNIPA-AAc, PNIPA-AAc-oligo12 i PNIPA-AAc-oligo123 oceniano wykonując

test MTT po 48 godzinnej inkubacji na liniach komórkowych *Hella* (rak szyjki macicy) i *Insulinoma* (rak trzustki). Test MTT polega na redukcji soli tetrazolowej do nierozpuszczalnego formazanu (kolor granatowy). Ilość zredukowanego czynnika MTT jest proporcjonalna do liczby żywych komórek w danej hodowli.

Jak pokazano na rysunkach wstawionych do rys. 55A i 55B wszystkie zbadane nanożele wykazywały doskonałą biokompatybilność i niską cytotoksyczność nawet przy wysokich stężeniach. Przeżywalność komórek w obecności niezmodyfikowanych nanożeli PNIPA-AAc przekraczała nawet 100%, a związane było to z tym, iż nanożel stanowił pożywkę do namnażania się komórek. Wyniki te świadczą również o wysokiej czystości nanożeli syntezowanych metodą bez użycia surfaktantów.

Kolejnym krokiem było zbadanie cytotoksyczności nanożeli zawierających różne stężenia doksorubicyny, patrz rysunki 55A i 55B. Zaobserwowałam, że największą skuteczność niszczenia komórek nowotworowych posiadał nanożel zawierający trzysegmentową hybrydę DNA. Większa skuteczność niszczenia komórek nowotworowych przez doksorubicynę uwalnianą z nośnika PNIPA-AAcoligo123 mogła być spowodowana stopniowym przedłużonym w czasie podawaniem leku. Dzięki temu komórki nowotworowe stopniowo ulegały niszczeniu, co powodowało większą sumarycznie cytotoksyczność. Natomiast podczas podawania leku bez nośnika komórki były narażone na dużą jednorazową dawkę medykamentu i w konsekwencji wiązało się to z mniejszą efektywnością sumarycznej cytotoksyczności.



Rys. 55. Test MTT żywotności dla komórek Hella (A) i komórek Insulinoma (B) po 48 godzinnej ekspozycji na działanie nanożeli z różnym stężeniem doksorubicyny. Rysunki wstawione: testy MTT żywotności komórek zarejestrowane dla pustych nośników nanożelowych.

9.1.9. Podsumowanie

Reasumując powyższe wyniki badań można stwierdzić, że opracowany został unikalny typ nanocząsteczkowego układu dostarczania leków oparty na nanożelach PNIPA-AAc z kowalencyjną modyfikacją oligonukleotydami, ulegającymi hybrydyzacji trzysegmentowej. Udowodniono, że możliwe jest kowalencyjne przyłączenie dwóch oligonukleotydów do sieci nanohydrożelu za pomocą grup akrylowych i hybrydyzacja do nich trzeciego odcinka komplementarnego za zasadzie 50:50. Parametry fizykochemiczne uzyskanych nanosystemów takie jak: rozmiar, potencjał zeta oraz aspekty struktury wewnętrznej sprzyjały penetracji tkanek nowotworowych.

Zsyntezowane nanożele PNIPA-AAc-oligo123 posiadały wyższą zdolność akumulacji leku przeciwnowotworowego - dokсорubicyny w stosunku do nanożeli niezmodyfikowanych ze względu na możliwość interkalacji leku pomiędzy pary zasad dsDNA. Fakt przechowywania leku w trzysegmentowych formach DNA pozwolił na stworzenie nośnika leku o przedłużonym czasie uwalniania, co skutkowało lepszym efektem terapeutycznym.

Uwalnianie leku z nanożeli zachodziło w podwyższonej temperaturze stosowanej rutynowo w terapii hipertermicznej. Natomiast mechanizm uwalniania Dox z nanożeli był wynikiem dwóch odwracalnych procesów: zmiany konformacji dwuniciowej trzysegmentowej struktury DNA oraz kurczenia się sieci hydrożelu.

Przedstawione nanożele posiadały dobrą biokompatybilność i nie powodowały cytotoksyczności na komórkach zdrowych. Natomiast badania cytotoksyczności nośników zawierających Dox na liniach komórek nowotworowych Hella i Insulinoma wykazały wysoką skuteczność niszczenia komórek nowotworowych, nawet wyższą niż dokсорubicyna podawana bez nośnika.

9.2. Nanożele sieciowane zhybrydyzowaną nicią DNA

Drugi etap moich badań zakładał syntezę nanożeli usieciowanych jedynie podwójną nicią DNA. Nie użyto żadnych dodatkowych środków sieciujących nanożel. Założono, że trzysegmentowa hybryda DNA utworzona podczas procesu polimeryzacji połączy bezpośrednio łańcuchy nanożelu powodując wewnętrzne sieciowanie nanocząstki. Do syntezy posłużyły mi sekwencje DNA użyte w poprzednim projekcie. W tym przypadku skupiłam się na aspekcie degradowalności sieci pod wpływem temperatury.

Idea akumulacji leku w procesie interkalacji była ta sama jak w poprzednim przypadku. Zakładano, że temperaturowe uwalnianie leku będzie zachodziło na dwa sposoby. Poprzez zmianę struktury sieci polimerowej i zmiany konformacyjne w DNA powodujące rozluźnienie

nici, jak i po zastosowaniu odpowiedniej temperatury powodującej denaturację nici, a zarazem degradację sieci nanożelu. Degradacja nanożelu miałaby być pomocna również przy usuwaniu pozostałości nośnika z organizmu. Trzysegmentowa hybryda DNA w tym typie nanożeli znajdowała się wewnątrz sieci, a nie na powierzchni, jak w poprzednim przypadku, co całkowicie zmieniło właściwości oraz charakter nośnika. W kolejnych podrozdziałach przybliżę dokładnie sposób syntezy, właściwości fizykochemiczne oraz badania komórkowe pozwalające na określenie przydatności tego typu nanożeli, jako degradablealnych nośników leków przeciwnowotworowych.

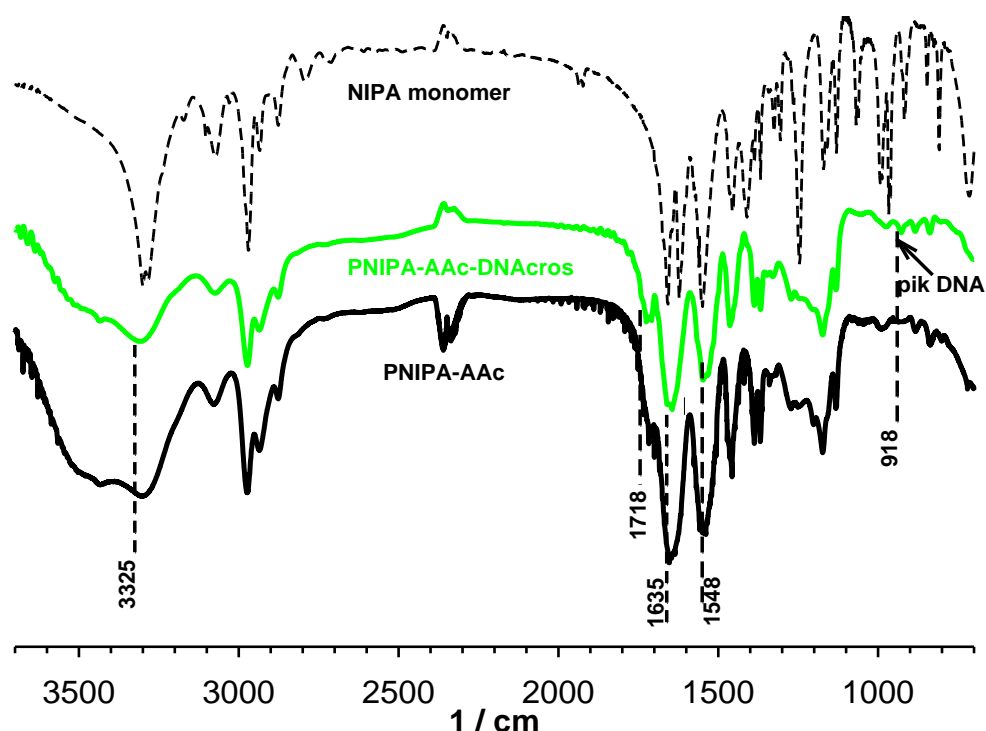
9.2.1. Synteza

Nanożele zostały zsyntezowane na bazie termoczułego polimeru PNIPA i czułego na pH kwasu akrylowego (AAc). Całkowite stężenie monomerów wynosiło 75 mM, a procentowa zawartość kwasu akrylowego wynosiła 10%. Do syntezy nie stosowano standardowych środków sieciujących takich jak metylenobisakryloamid. Jako crosslinkera/łącznika zastosowano trzy odcinki oligonukleotydów tworzące trzysegmentową hybrydę DNA. Dwa z nich (oligo1 i oligo2) były zmodyfikowane grupami akrylowymi, co pozwoliło na kowalencyjne włączenie ich w sieć polimerową. Trzeci oligonukleotyd (oligo3) był komplementarny w połowie do pierwszej nici i w połowie do drugiej nici. Całkowite stężenie DNA w zadanej objętości syntezy (10 ml) wynosiło $3,815 \mu\text{mol L}^{-1}$. Obliczono, że procentowa zawartość DNA użytego jako środka sieciującego w stosunku do innych monomerów wynosiła 3,5%. W tym przypadku reakcja polimeryzacji zachodziła jednocześnie z procesem polimeryzacji. W praktyce, po ogrzaniu monomerów i nici oligo1, oligo2 ($T = 60^\circ\text{C}$, warunki beztlenowe) dodawany był inicjator reakcji KPS (10 mg/ml) oraz trzecia komplementarna nić DNA (oligo3). Temperaturę polimeryzacji ustalono tak, żeby oscylowała w okolicy średniej temperatury topnienia wszystkich oligonukleotydów. Reakcję syntezy prowadzono przez 5 h. Następnie powstały roztwór szybko chłodzono w łaźni lodowej i przechowywano przez 24 h w 5°C . Otrzymane nanożele były oczyszczane przez dializę. Postęp oczyszczania kontrolowany był przez konduktometryczne pomiary dializatu.

Nanożele porównywano z niezmodyfikowanymi nanożelami PNIPA-AAc i nanożelami PNIPA-AAc-oligo123, w których hybrydyzacja następowała po syntezie z użyciem środka sieciującego BIS. Stechiometryczne ilości użytych składników były identyczne we wszystkich syntezach.

Aby udowodnić, że zaszła polimeryzacja z użyciem trzysegmentowej hybrydy DNA jako środka sieciującego, przeprowadzono badania FTIR. Badania te potwierdziły obecność charakterystycznych drgań dla polimeru PNIPA oraz obecność oligonukleotydów. Dokładna

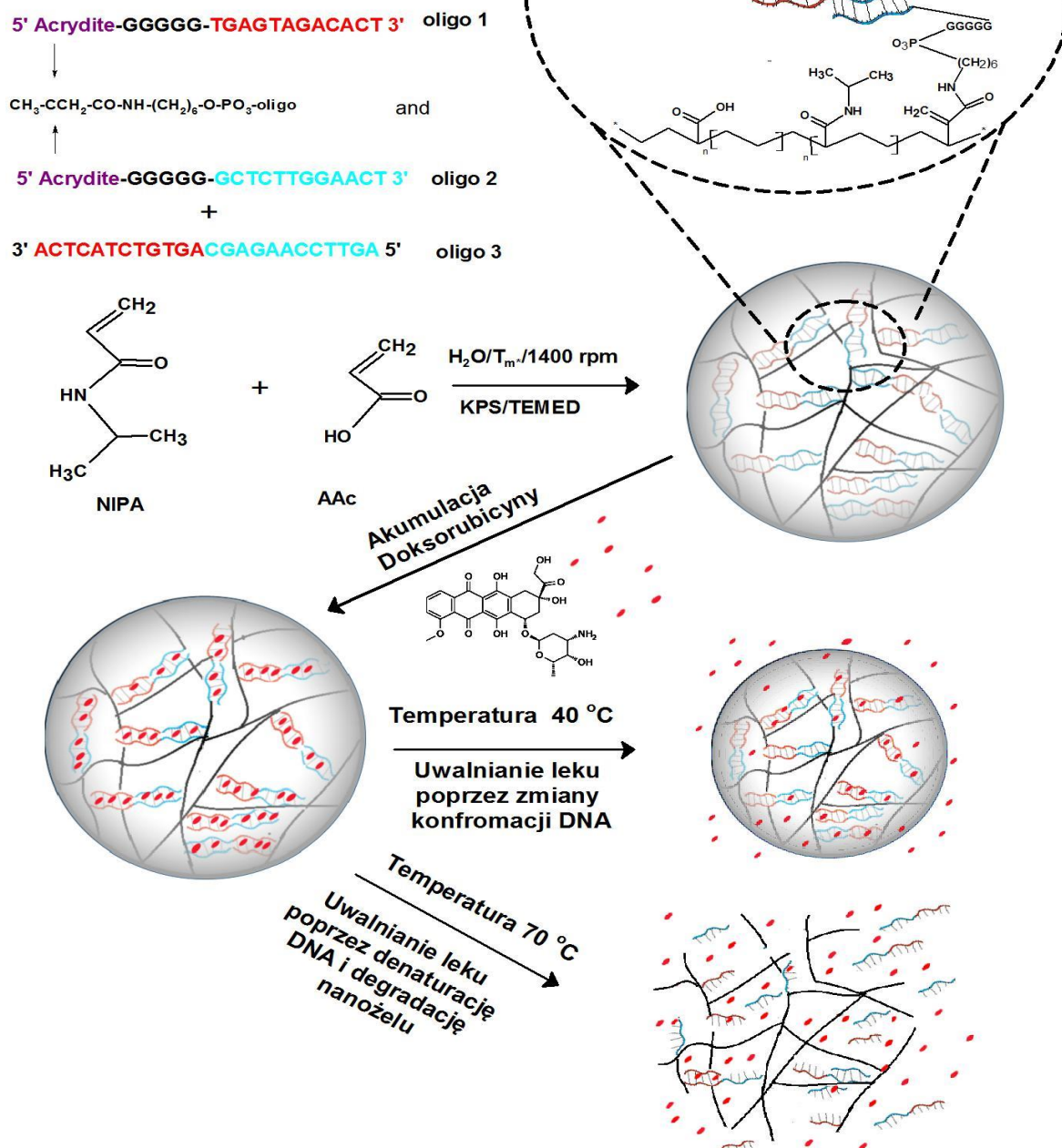
analiza poszczególnych typów drgań została przedstawiona w poprzednim rozdziale. Na rysunku 56 znajdują się widma FTIR zarówno na nanożeli PNIPA-AAc-DNAcros jak i czystych nanożeli PNIPA oraz monomeru NIPA. Widać wyraźne zmiany w widmie NIPA po polimeryzacji. Związane są one z włączaniem się wody w strukturę polimerową sieci nanohydrożelu (pik 3325 cm^{-1}). Widmo to ze względu na swój jakościowy charakter nie różni się zasadniczo od widma wykonanego dla nanożeli gdzie trzysegmentowa hybryda DNA była tworzona po polimeryzacji. Ukazuje jednak, że polimeryzacja w takim układzie i w tych warunkach syntezy utworzyła nanożel sieciowany trzysegmentową hybrydą DNA.



Rys. 56. Porównanie widm FTIR dla nanożeli PNIPA-AAc-DNAcros, niezmodyfikowanych nanożeli PNIPA-AAc oraz monomeru NIPA.

Na rysunku 57 umieszczono schemat syntezy oraz przedstawiono mechanizmy uwalniania doksorubicyny z nanożeli za pomocą czynnika temperaturowego. Założono, że w temperaturze 45 °C (niska hipertermia) uwalnianie leku nie będzie powodowało denaturacji nici DNA, a co za tym idzie struktura nanożeli nie zostanie naruszona. W tej temperaturze możliwe są jednak lokalne zmiany konformacyjne hybrydy DNA, powodujące rozluźnienie nici i łatwiejsze uwalnianie leku. Natomiast w temperaturze 70 °C (wysoka hipertermia) następuje rozerwanie wiązań wodorowych tworzących podwójną helisę DNA i denaturacja prowadząca do dezintegracji sieci polimerowej i degradacji nanożelu.

A



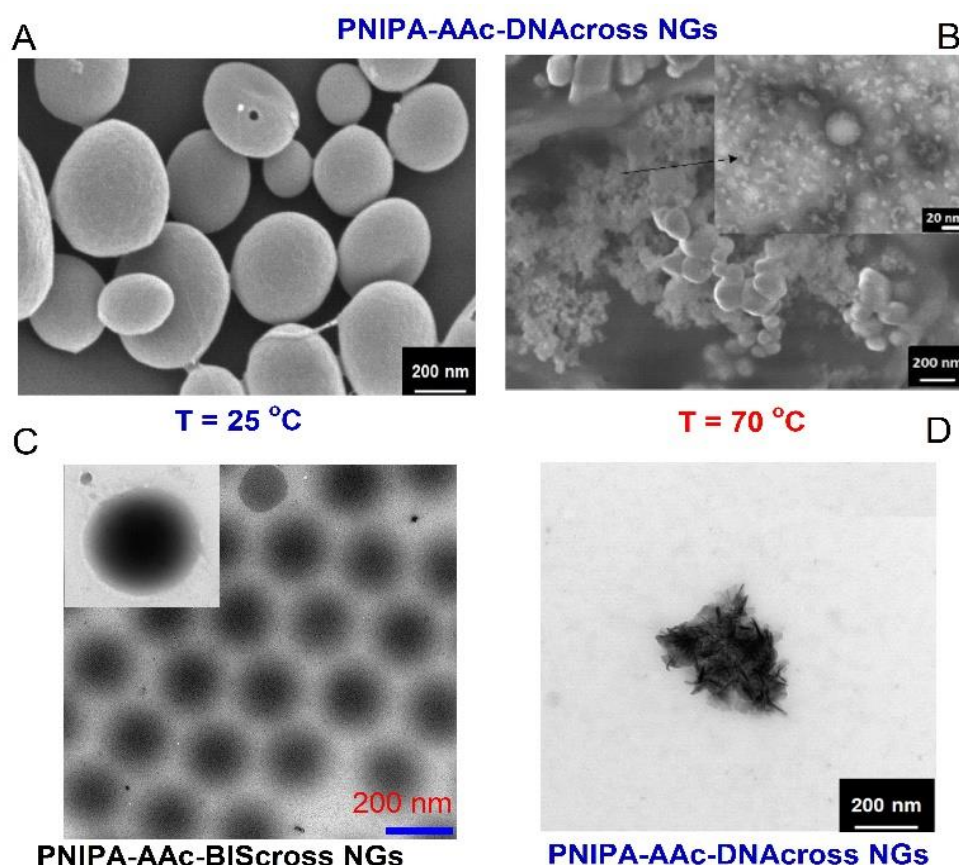
Rys. 57. Schemat syntezy oraz mechanizmu uwalniania leku z nanożeli pod wpływem wzrostu temperatury.

9.2.2. Morfologia

Morfologia zsyntezowanych nanosystemów była porównana przy użyciu technik SEM, TEM i STEM. Na rysunku 58 możemy umieszczone mikrografy uzyskane przy użyciu tych technik. Rysunki 58A i 58B przedstawiają kolejno obrazy SEM i STEM wykonane dla nanożeli

sieciowanych hybrydą DNA. Rys 58A przedstawia nanożele w 25 °C; widoczne są sferyczne gładkie obiekty o średnicy około 300 nm. Ze względu na to, że próbki były liofilizowane, możliwe, że część związanej wody pozostała w nanożelach w postaci krystalicznej. Dlatego też rozmiar nanożeli był wyższy o około 50% w porównaniu do stanu częściowo skurczonego, w jakim nanożele występują w temperaturach fizjologicznych. Rysunek 58B przedstawia zdjęcia STEM nanożeli po podgrzaniu ich do temperatury 70 °C (5 minut grzania). Możemy zauważyć, że nastąpiła częściowa degradacja sieci nanożelu, gdyż na zdjęciach obecne są zarówno składniki o średnicy ok 200 nm jak i dużo mniejsze obiekty mające rozmiar ok 20 nm.

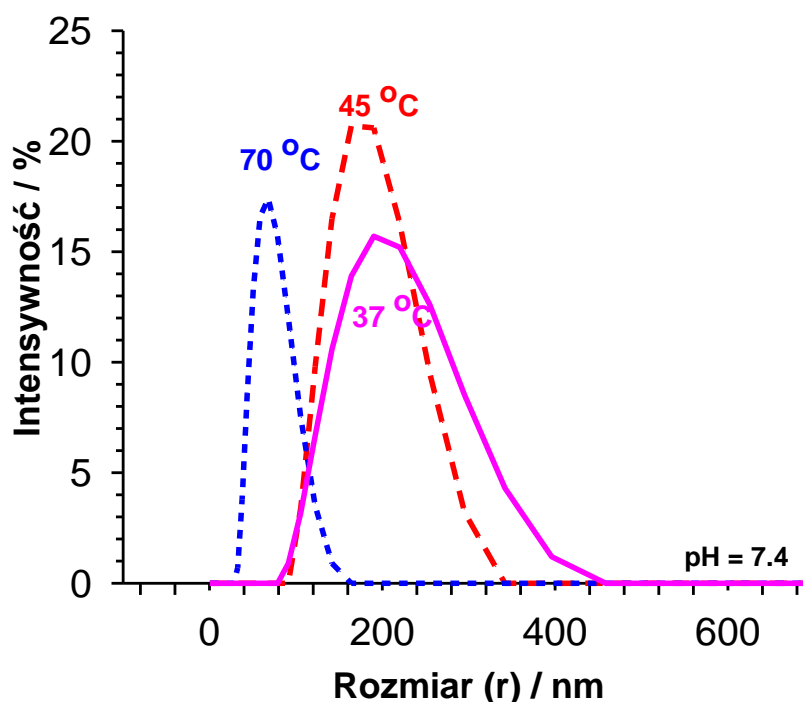
Natomiast na rysunkach 58C i 58D mamy porównanie zdjęć z transmisyjnego mikroskopu elektronowego niezmodyfikowanych nanożeli PNIPA-AAc i nanożeli sieciowanych hybrydą DNA. Nanożele sieciowane dwuniciową molekułą DNA posiadają pierzastą strukturę i nieregularne poszarpane kształty, w przeciwieństwie do regularnych nanożeli PNIPA-AAc. Próbki kontrastowane były octanem uranylu, który ma powinowactwo do grup fosforanowych obecnych w DNA i powoduje ciemne wybarwienie próbki w miejscach obecności DNA, patrz rys. 58D.



Rys. 58. (A) Zdjęcie SEM liofilizowanych nanożeli wykonane w temperaturze 25 °C (B) Zdjęcia STEM nanożeli po degradacji w temperaturze 70 °C (pH 5,5, bez etapu liofilizacji). (C) Zdjęcia TEM nanożeli niezmodyfikowanych PNIPA-AAc, (D) Zdjęcie nanożeli PNIPA-AAc-123cros. Zdjęcia TEM kontrastowane octanem uranylu.

9.2.3. Analiza rozmiaru cząstek i potencjału zeta

Rozmiar oraz potencjał zeta nanożeli usieciowanych DNA został określony za pomocą techniki dynamicznego rozpraszania światła. Typowy wykres rozkładu rozmiaru nanożeli o różnych promieniach hydrodynamicznych w pH = 7,4 i różnych temperaturach został przedstawiony na rysunku 59. Analizując wykres możemy zauważyć, że wraz ze wzrostem temperatury nanocząstki są mniejsze i bardziej monodispersyjne.



Rys.59. Wykres dystrybucji promienia hydrodynamicznego cząstek dla nanożeli PNIPA-AAcoligo123cros w różnych temperaturach.

Wszystkie oszacowane wielkości promieni hydrodynamicznych (D_h) oraz potencjały zeta (ζ) w wybranych temperaturach oraz pH zostały przedstawione w tabeli 12.

Typ nanożelu	PNIPA-AAc (pH 7,4)	PNIPA-AAc- 123cros (pH 7,4)	PNIPA-AAc- 123cros (pH 5,5)
Rozmiar w 25 °C (nm)	495,8±11,1	398,2±9,8	218,2±5,2
Rozmiar w 37 °C (nm)	255,5±8,5	265,1±7,5	174,1±5,5
Rozmiar w 45 °C (nm)	214,6±4,5	169,2±6,7	116,2±8,8
Rozmiar w 70 °C (nm)	213,7±3,4	79,9±2,4	38,1±1,2

Potencjał zeta w 25 °C (mV)	-11,3±1,3	-5,91±1,5	-8,21±1,6
Potencjał zeta w 37 °C (mV)	-22,4±1,7	-13,7±1,9	-17,2±1,3
Potencjał zeta w 45 °C (mV)	-30,1±1,5	-21,6±1,7	-26,1±1,5
Potencjał zeta w 70 °C (mV)	-35,1±1,9	-28,3±1,2	-38,1±1,8

Tabela 12. Zestawienie rozmiarów (promieni hydrodynamicznych) oraz wartości potencjałów zeta dla nanożeli sieciowanych hybrydą DNA i porównawczo dla czystych nanożeli PNIPA w wybranych temperaturach i określonych warunkach pH.

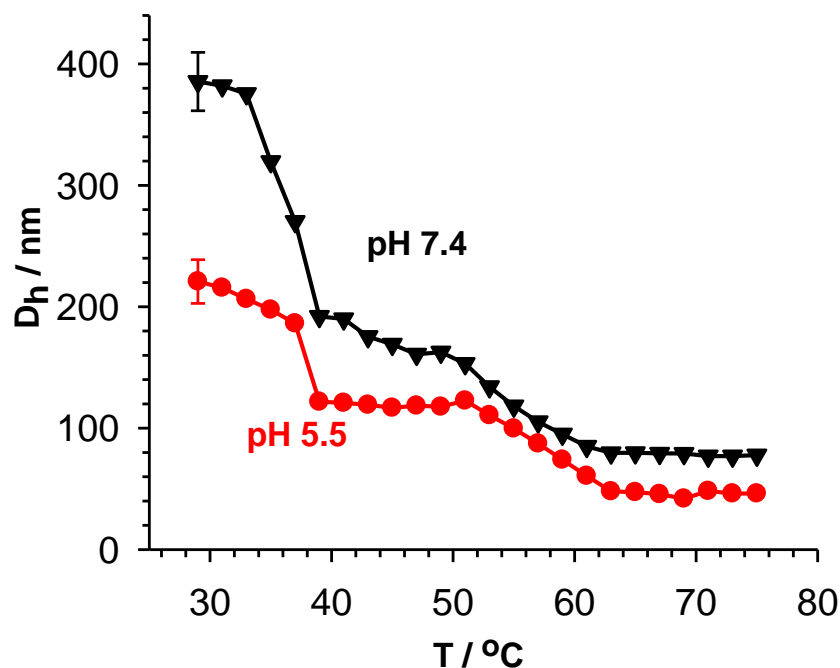
Średnia wielkość nanożeli w temperaturach 37, 45, oraz 70° C wynosiła kolejno 265, 169 i 80 nm. W warunkach lekko kwaśnego pH (pH = 5,5) rozmiar nanożeli był niższy o około 60% w stosunku do nanożeli w pH obojętnym. Było to spowodowane protonowaniem ugrupowań –COOH.

Potencjały zeta przyjmowały wartości ujemne zarówno w warunkach pH obojętnego jak i lekko kwaśnego i stawały się bardziej ujemne wraz ze wzrostem temperatury. W poprzednim typie nanożeli (opisywanym w rozdziale 9.1.), zauważyłam, że wprowadzenie oligonukleotydów do nanożelu sieciowanego za pomocą metylenobisakryloamidu powoduje liniowy spadek wartości potencjału w zależności od stężenia DNA i obniża się on dodatkowo w wyższej temperaturze. W przypadku nanożeli sieciowanych za pomocą trzysegmentowej hybrydy DNA zauważyłam podobny efekt. Jednak początkowe wartości potencjału zeta były nieco wyższe niż dla nanożeli sieciowanych za pomocą BIS. Może sugerować to, że ułożenie podwójnych nici DNA jest inne. Nici są bardziej obecne wewnątrz sieci niż na powierzchni nanocząstki.

W podsumowaniu można stwierdzić, że, potencjał zeta i wielkość nanożeli sieciowanych za pomocą hybrydy DNA były optymalne z punktu widzenia interakcji z komórkami nowotworowymi.

9.2.4. Badanie objętościowego przejścia fazowego i degradacji sieci

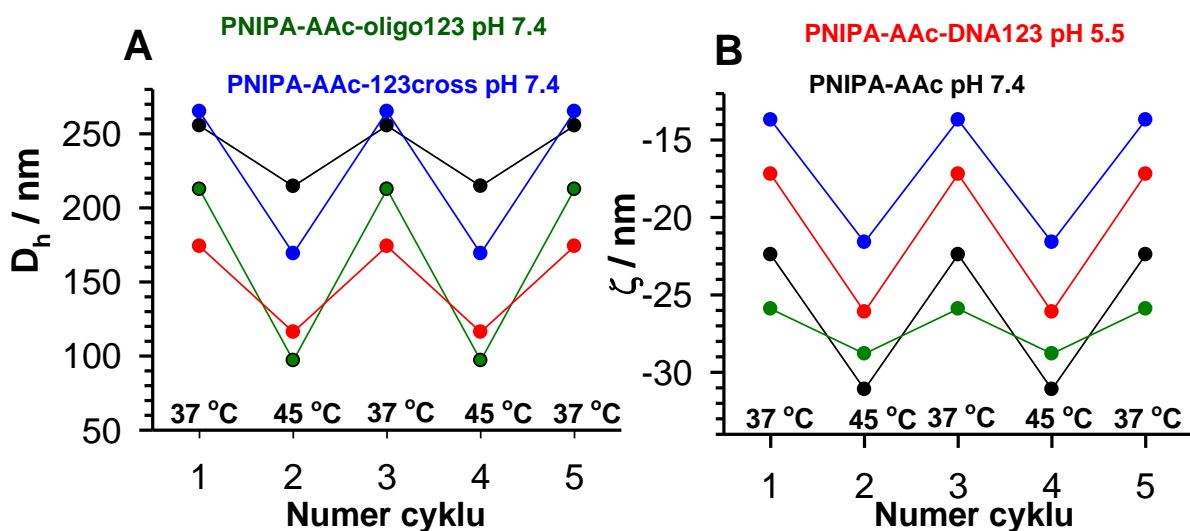
Ważnym etapem badań nanożeli PNIPA-AAc-123cros pod kątem użycia ich jako degradowalnych nośników leków była ocena objętościowego przejścia fazowego. Na rysunku 60 widzimy krzywe zależności promienia hydrodynamicznego (D_h) od temperatury dla dwóch wartości pH.



Rys. 60. Zależności promienia hydrodynamicznego od temperatury ukazujące przejście fazowe nanożeli PNIPAAc-123cros dla dwóch wartości pH (5,5 i 7,4).

Na rysunku 60 możemy zauważyć dwa przejścia fazowe. Pierwsze występuje w temperaturze fizjologicznej około 37 °C (podobnie jak w nanożelach zmodyfikowanych DNA a sieciowanych BIS). Następnie rozmiar stopniowo maleje aż do temperatury około 40°C i utrzymuje się na tym poziomie do około 50 °C. Podczas dalszego grzania rozmiar drastycznie maleje aż do wartości poniżej 100 nm. Te zmiany potwierdzają niejako degradację nanożelu po przyłożeniu wyższej temperatury. Pierwszy spadek rozmiaru w 37 °C można tłumaczyć odwracalnym kurczeniem się matrycy polimerowej PNIPAAc. Natomiast drugi spadek przedstawia całkowitą nieodwracalną dezintegrację sieci spowodowaną denaturacją dwuniciowego DNA. Dodatkowym efektem zauważalnym na analizowanym wykresie jest spadek rozmiaru cząstek w pH lekko kwaśnym. Początkowy rozmiar nanożeli w pH 5,5 jest około o 50% niższy niż rozmiar nanożeli w pH fizjologicznym.

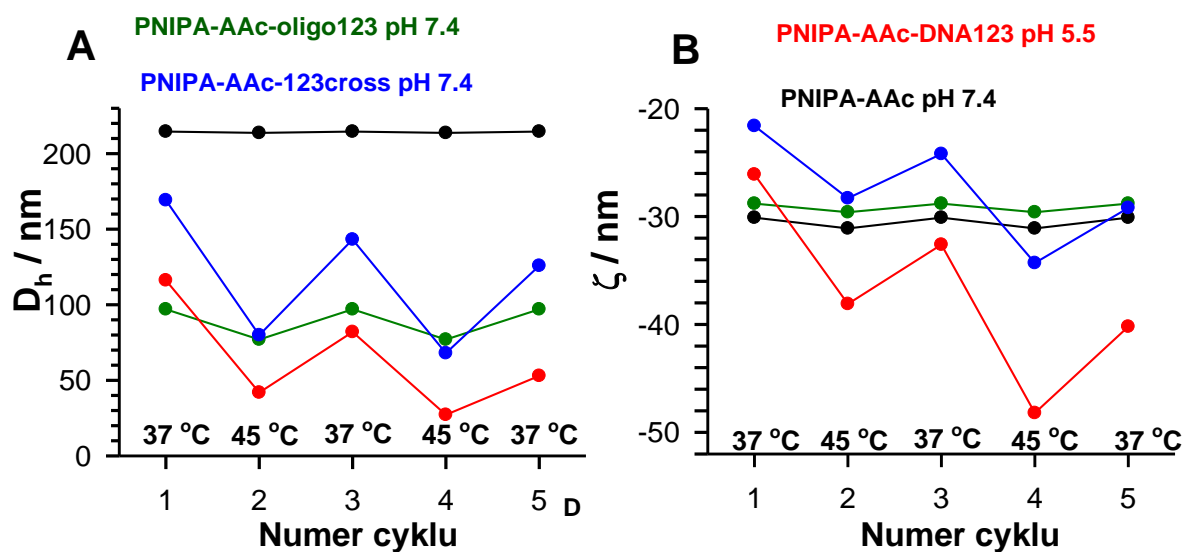
Zbadałam również jak zmienia się rozmiar i potencjał zeta nanożeli w sytuacji, kiedy naprzemiennie grzejemy i chłodzimy próbki w zakresie temperatur 37 do 45 °C. Na rysunku 61 przedstawiono zmiany promienia dynamicznego (A) oraz potencjału zeta (B) w cyklach temperaturowych dla nanożeli sieciowanych hybrydą DNA w dwóch wartościach pH.



Rys. 61. Odwracalność zmian rozmiaru (A) oraz potencjału zeta (B) mierzone w cyklach grzania i chłodzenia od temp 37 do 45 °C.

Zmiany rozmiaru jak i potencjału zeta we wszystkich przypadkach miały ewidentnie charakter odwracalny. Można stwierdzić, że w badanym zakresie temperatur podczas ogrzewania nanożeli nie obserwujemy znaczących zmian w strukturze polimerowej sieci, ulega ona jedynie kurczeniu, co jest normalnym zachowaniem nanożeli zbudowanych na bazie polimeru PNIPA.

Rysunki 62A i 62 B przedstawiają zmiany rozmiaru i potencjału zeta w cyklach grzania i chłodzenia nanożeli w przedziale wyższych temperatur: od 45 do 70 °C.

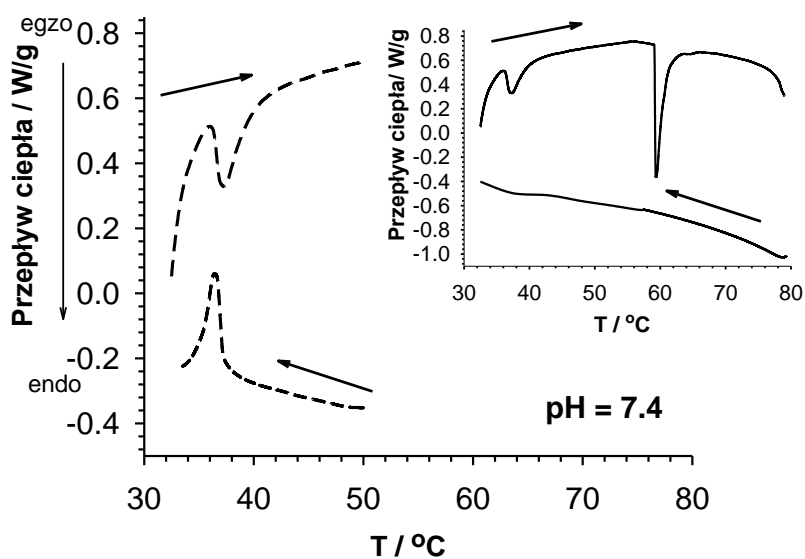


Rys. 62. Odwracalność zmian rozmiaru (A) oraz potencjału zeta (B) mierzona w cyklach grzania i chłodzenia od temp 37 do 45 °C.

Rysunki 62 wskazują, że dla nanożeli sieciowanych trzysegmentową hybrydą DNA, w każdym kolejnym cyklu maleje zarówno rozmiar jak i potencjał zeta. Po 5 cyklach (15 minut) ustala się na stałym poziomie, co może świadczyć o całkowitej degradacji nanożelu. Degradacja nanożelu w tym wypadku związana jest z denaturacją DNA, co skutkuje rozbiciem łączników nanożelu i drastyczną zmianą rozmiaru.

Opisane w poprzednim rozdziale nanożele zmodyfikowane DNA z użyciem crosslinkera BIS posiadały całkowicie odwracalne cykle w tym zakresie temperatur. Związane było to z tym, że, pomimo iż w zadanej temperaturze 70 °C denaturacja nici DNA musiała nastąpić, jednak dochodziło do szybkiej regeneracji podwójnej struktury nici. DNA w tamtym przypadku nie budowało wewnętrznej sieci nanożelu, ale znajdowało się na jego powierzchni. Oczywiście było, że niezmodyfikowane nanożele PNIPA-AAc w zastosowanym zakresie temperaturowym nie wykazywały znacznych zmian zarówno rozmiaru jak i potencjału zeta.

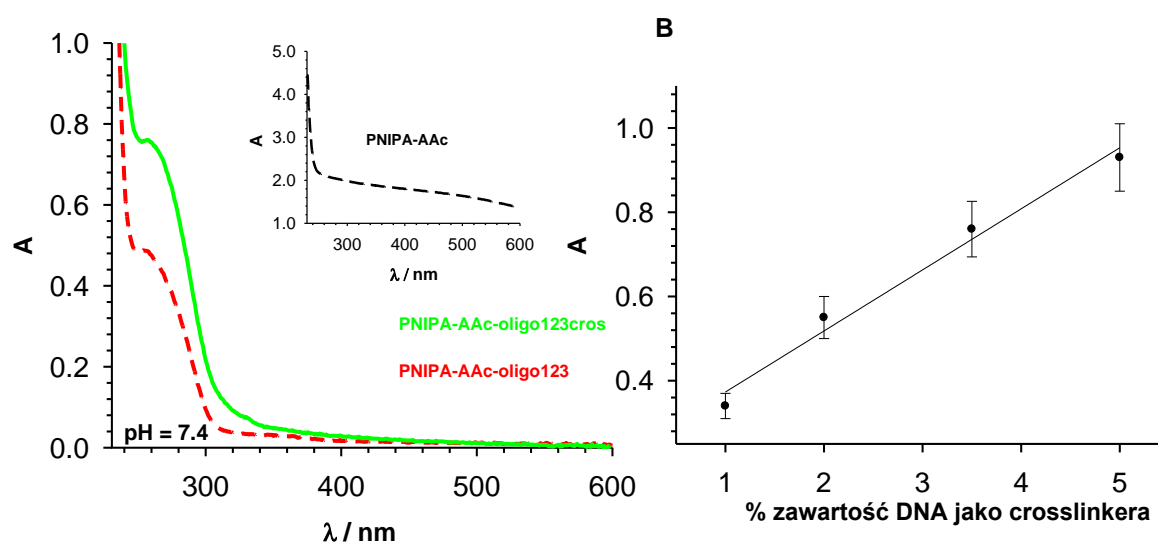
Aby dodatkowo potwierdzić, że nanożel degraduje się pod wpływem odpowiednio wysokiej temperatury przeprowadzono badania za pomocą skaningowej kalorymetrii różnicowej (DSC). Na rysunku 63 widzimy, że podczas grzania nanożelu otrzymujemy odwracalny pik w okolicy 37 °C, co świadczy o kurczeniu się sieci polimerowej. Po rozszerzeniu zakresu grzania do 80 °C (rysunek wstawiony) widoczny jest kolejny pik w okolicach 60 °C, który nie ma odpowiednika w skanie odwrotnym. Pik ten jest bezpośrednio związany z denaturacją środka sieciującego, jakim jest DNA. Brak pików powrotnego udowadnia, że sieć polimerowa uległa degradacji i potwierdza wcześniejsze wnioski.



Rys. 63. Zależność przepływu ciepła od temperatury dla nanożeli PNIPA-AAc-DNAcros, Krzywa górna odpowiada procesowi kurczenia nanożelu, krzywa dolna odpowiada procesowi pęcznienia. Rysunek wstawiony: wykres DSC ukazujący nieodwracalną degradację nanożeli PNIPA-AAc-DNAcros w temperaturze 60 °C.

9.2.5. Badanie obecności DNA i zmian w jego strukturze

Obecność oligonukleotydów w sieci nanożelu została potwierdzona za pomocą spektroskopii UV-Vis. Pomiary absorbancji były prowadzone po procesie dializy, aby wypłukać wszystkie niezwiązane formy DNA. Absorbancję mierzono przy długości fali 260 nm, charakterystycznej dla oligonukleotydów. Na rysunku 64A zostały przedstawione piki pochodzące od trzysegmentowej hybrydy DNA wprowadzonej do nanożelu w formie środka sieciującego (PNIPA-AAc-oligo123cros), gdzie polimeryzacja zachodziła równocześnie z hybrydyzacją nici oraz od trzysegmentowej hybrydy wprowadzonej do nanożelu w obecności środka sieciującego BIS, gdzie hybrydyzacja następowała po procesie polimeryzacji (PNIPA-AAc-oligo123).



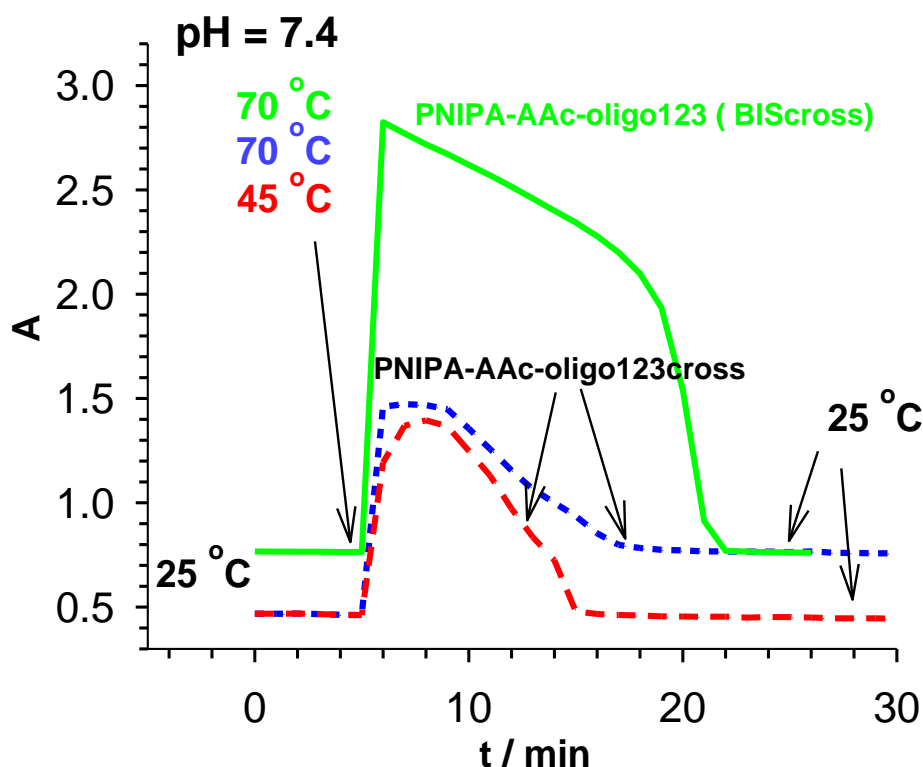
Rys. 64. (A) Widmo UV-Vis dla oligonukleotydów wprowadzonych do sieci nanożeli PNIPA-AAc-oligo123cros i PNIPA-AAc-oligo123, Rysunek wstawiony: widmo niezmodyfikowanego nanożelu PNIPA-AAc. (B) Zależność absorbancji od procentowej zawartości DNA jako środka sieciującego nanożel.

Możemy zauważyć, że absorbancja pochodząca od DNA dla nanocząstek sieciowanych za pomocą trzysegmentowej hybrydy DNA (wprowadzone zostały ilości równo molowe) jest niższa w stosunku do poprzednio omawianych nanożeli. Związane jest to z tym, że po wnikięciu DNA do wewnętrznej sieci nanożelu zmniejsza się dostępność par zasad ze względu na efekty steryczne. Obserwujemy to bezpośrednio jako spadek absorbancji w stosunku do nanożeli gdzie hybryda DNA znajdowała się na powierzchni.

Bazując na porównaniu początkowej absorbancji hybryd DNA utworzonych w roztworze i tych obecnych jako środki sieciujące w nanożelu oszacowano, że wydajność wprowadzania DNA do nanożelu wynosiła 80%.

Na rysunku 64B przedstawiona została zależność absorbancji od procentowej ilości wprowadzonego DNA jako środka sieciującego w stosunku do pozostałych monomerów. Absorbancja rosła liniowo wraz ze stężeniem DNA. W badaniach zastosowano nanożele z 3,5% zawartością DNA, ponieważ wartość ta znajdowała się w środku krzywej kalibrowania przedstawionej na rysunku 64B. Ważne było, aby wartości absorbancji znajdowały się w zakresie, dla których obowiązuje prawo Lamberta Beera.

Techniką UV-Vis zbadano również zmiany zachodzące w DNA podczas ogrzewania nanożeli. Na rysunku 65 została przedstawiona zależność absorbancji od czasu, w temperaturach stosowanych rutynowo w terapii hipertermicznej nowotworów (45 i 70 °C).



Rys. 65. Zmiany absorbancji w czasie mierzone dla DNA ($\lambda = 260 \text{ nm}$) po podgrzaniu do temperatur 45 i 70 °C i chłodzeniu do temperatury początkowej 25 °C. Zawartość DNA jako środka sieciującego w nanożelu wynosiła 3,5%.

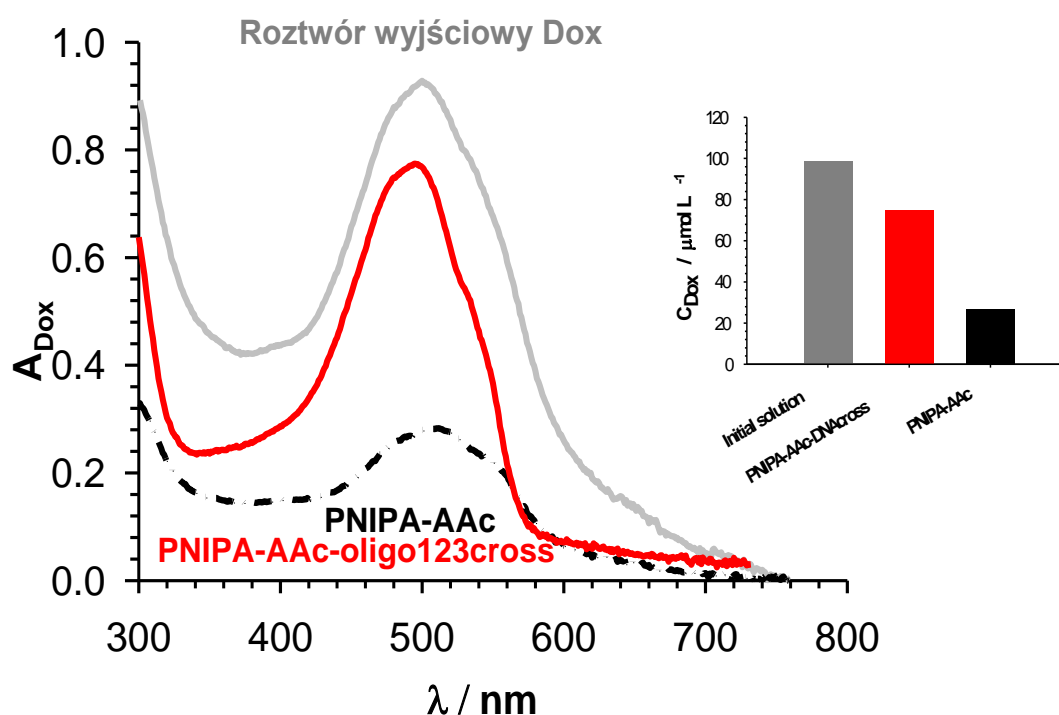
Wyniki wykazują, że po podgrzaniu do temperatury 70 °C nanożelu zawierającego trzysegmentową hybrydę DNA jako środek sieciujący, następują zmiany w DNA o charakterze nieodwracalnym. Wzrost absorbancji w stosunku do wartości początkowej świadczy o nieodwracalnej denaturacji DNA, powodującej degradację sieci nanożelu. Natomiast przy zastosowaniu niskiej hipertermii 45 °C obserwujemy nagły wzrost absorbancji spowodowany lokalną denaturacją i kurczeniem się sieci nanożelu. Jednak po określonym czasie absorbancja ta wraca do swojego początkowego poziomu. Można wnioskować, że po przyłożeniu

temperatury 45 °C w DNA zachodzą lokalne zmiany konformacyjne, które mogą mieć wpływ na uwalnianie leku, jednak struktura sieci polimerowej zostaje zachowana.

Porównałam również zachowanie nanożeli PNIPA-AAc-oligo123, gdzie środkiem sieciującym był BIS po ogrzewaniu do temperatury 70 °C. Wyniki wykazały, iż, mimo że temperatura ta jest wyższa od temperatury topnienia oligonukleotydów (zachodzi denaturacja DNA) absorbancja wraca do początkowego poziomu. Związane jest to z tym, że w tym przypadku DNA znajdowało się na powierzchni nanożelu i mimo, iż zaszła denaturacja nici to nastąpiła później szybka renaturacja i powrót do stanu początkowego bez zmian w strukturze nanożelu.

9.2.6. Akumulacja i uwalnianie leku in vitro

Kolejnym etapem moich badań była akumulacja doksorubicyny do nanożeli. Rysunek 66 przedstawia absorbancję ($\lambda = 485 \text{ nm}$) dla doksorubicyny mierzona bezpośrednio w roztworze nanożeli po akumulacji i usunięciu niezakumulowanej części leku poprzez odwirowanie.



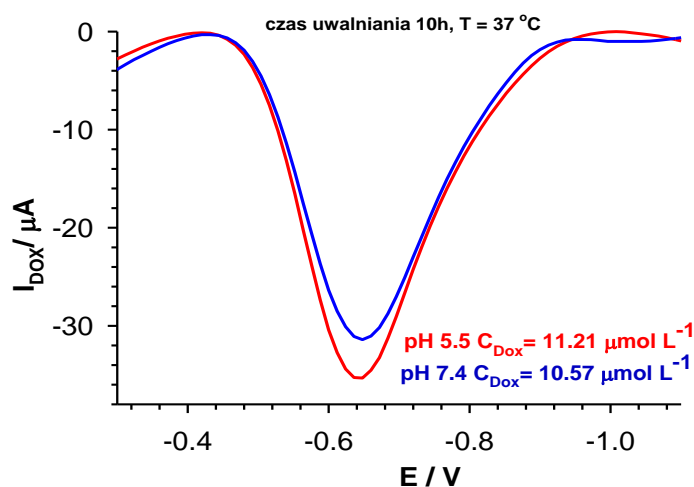
Rys. 66. Absorbancja doksorubicyny w nanożelach sieciowanych trzysegmentową hybrydą DNA oraz niezmodyfikowanych mierzona za pomocą techniki UV-Vis ($\lambda = 485 \text{ nm}$). Rysunek wstawiony: wartość stężenia wprowadzonego leku ($\mu\text{mol L}^{-1}$) do poszczególnych nanożeli.

Na rysunku 66 możemy zaobserwować znacznie większą efektywność akumulacji leku dla nanożeli sieciowanych zhybrydowaną nicią DNA niż dla nanożeli niezmodyfikowanych. Efektywność ta jest również większa w stosunku do nanożeli omawianych w poprzednim

rozdziale (PNIPA-AAc-oligo123/BIS) przy zastosowaniu takich samych ilości wprowadzanego leku. Do nanożeli sieciowanych zhybrydizowanym DNA zakumulowało 84% leku z roztworu wyjściowego, czyli o 54% więcej w stosunku do nanożeli niezmodyfikowanych.

Aby zbadać parametry wiązania dokсорubicyny w podwójnej nici DNA został zastosowany model McGhee i von Hippel'a. Dokładne omówienie tego modelu zostało przedstawione w poprzednich rozdziałach pracy (9.1.3). Obliczyłam wartości stałych oddziaływania K oraz parametru n związanego z liczbą wiążących jednostek w DNA zajętych przez jedną cząsteczkę ligandu/leku. Wartości te zostały obliczone po założeniu, że cząsteczki Dox wiążą się do nici dsDNA obecnych w nanożelu przy pomocy oddziaływań niekooperatywnych [254]. Wartości charakteryzujące interkalację (K_1 i n_1) oraz interakcje elektrostatyczne (K_2 i n_2) wynosiły kolejno: $K_1 = 2,07 \pm 0,01 \cdot 10^6$, $n_1 = 2,15 \pm 0,02$; $K_2 = 0,0072 \pm 0,005 \cdot 10^6$, $n_2 = 5,86 \pm 0,03$. Powyższe wyniki sugerują, że preferowanym typem wiązania Dox w cząsteczce dsDNA sieciującej nanożele jest interkalacja pomiędzy pary zasad.

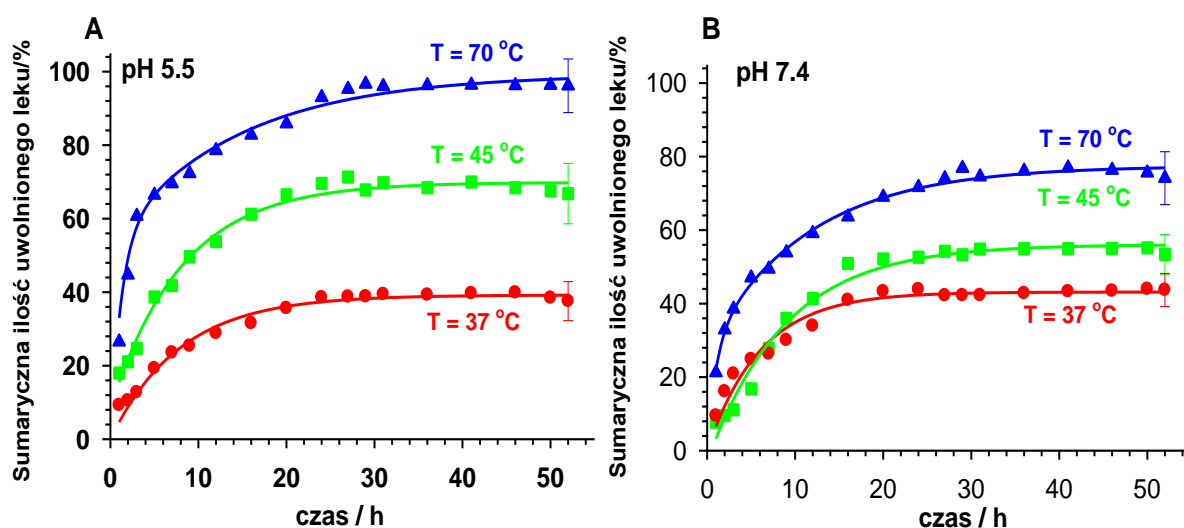
Kolejnym etapem badań było ustalenie profili uwalniania *in vitro* dokсорubicyny z nanożeli w dwóch różnych pH (5,5 i 7,4); gdzie czynnikiem uwalniającym była podwyższona temperatura. W tym celu do oznaczania stężenia Dox w dializacie użyłam technikę woltamperometrii fali prostokątnej (SWV). W badaniu tą metodą wykorzystywany jest pik elektrootleniania i elektroredukcji ugrupowań hydrochinonu i chinionu obecnych w cząsteczce Dox. Przykładowe piki woltamperometryczne Dox w roztworze wykonane metodą SWV zostały umieszczone na rysunku 67.



Rys. 67. Typowe sygnały SWV Dox uzyskane po 10 godzinach uwalniania jej w określonym pH.

Stwierdzono, że zależność między prądami maksymalnymi w technice SWV a stężeniem Dox w roztworze była liniowa w dostatecznie dużym zakresie stężeń, a więc umożliwiała wykorzystanie tej metody do monitoringu ilości uwalnianej dokсорubicyny. Należy podkreślić, że metoda SWV charakteryzuje się znacznie większą czułością niż metody spektroskopowe, co pozwoliło na detekcję bardzo niskich stężeń uwalnianego leku.

Na rysunkach 68A i 68B przedstawiono profile uwalniania leku wyznaczone w oparciu o prądy SWV Dox w warunkach fizjologicznych i w lekko kwaśnym środowisku charakterystycznym dla komórek nowotworowych. Badania wykonano w trzech temperaturach: fizjologicznej, niskiej hipertermii 45 °C i wysokiej hipertermii 70 °C. Należy podkreślić, że uwalnianie leku po podgrzaniu do wysokiej temperatury hipertermii, w organizmie ludzkim stosowane byłoby tylko miejscowo, przy zastosowaniu punktowej ablacji laserowej w miejscu chorobowo zmienionym.



Rys. 68. Profile uwalniania dokсорubicyny w czasie w różnych temperaturach w pH (A) charakterystycznym dla komórek nowotworowych pH=5,5, (B) fizjologicznym, pH=7,4.

Analizując powyższe profile uwalniania możemy zauważyć, że w temperaturze 37 °C (brak istotnych zmian strukturalnych DNA) ilości uwolnionego leku w przypadku obu wartości pH były podobne. Przy niskiej hipertermii (45 °C) następowało wyższe uwalnianie leku niż w warunkach fizjologicznych, co uwarunkowane było przez lokalne zmiany w strukturze DNA oraz kurczenie się sieci hydrożelowej. Należy podkreślić, że po podgrzaniu do tej temperatury nanożele wracały do swoich poprzednich rozmiarów, dzięki czemu mogły przebywać dłużej w ustroju, a Dox mógł być uwalniany poprzez pulsacyjne zmiany temperatury.

Następnie po zastosowaniu temperatury 70 °C; używanej w terapii wysokiej hipertermii z ablacją laserową, następował szybki wyrzut dużej ilości leku. W tej temperaturze struktury DNA obecne w sieci nanożelu ulegały denaturacji powodując degradację nanożelu. W takich

warunkach (pH 5,5), uwolniła się praktycznie całkowita ilość leku zawartego w nanożelu (98%). Dodatkowo, porównując wykresy 68A i 68B można zauważyć, że niższe pH stymuluje większe uwalnianie leku, co ma zasadnicze znaczenie w przypadku uwalniania leków w środowisku komórek nowotworowych. Należy również zauważyć, że degradacja matrycy nośnika może być również użyteczna przy późniejszym wydalaniu jego resztek z organizmu ludzkiego.

Proces uwalniania dokсорubicyny z nanożeli był analizowany za pomocą modelu Korsmeyera - Pappas'a. W tabeli 13 zostało przedstawione porównanie oszacowanych wartości parametrów n i k dla nanożeli PNIPA-AAc-oligo123cros dla dwóch wartości pH.

Temperatura	Parametry uwalniania Dox		
	k	n	r
PNIPA-AAc-DNAcros pH 5,5			
37 °C	0,663±0,022	0,470±0,020	0,990
45 °C	0,504±0,012	0,360±0,012	0,994
70 °C	0,310±0,006	0,205±0,060	0,997
PNIPA-AAc-DNAcros pH 7,4			
37 °C	0,562±0,030	0,451±0,027	0,986
45 °C	0,502±0,048	0,410±0,051	0,985
70 °C	0,486±0,018	0,340±0,017	0,987

Tabela 13. Dopasowane parametry modelu Peppas'a do danych eksperymentalnych nanożeli PNIPA-AAc-oligo123cros otrzymanych w dwóch wartościach pH, r -współczynnik dopasowania do modelu.

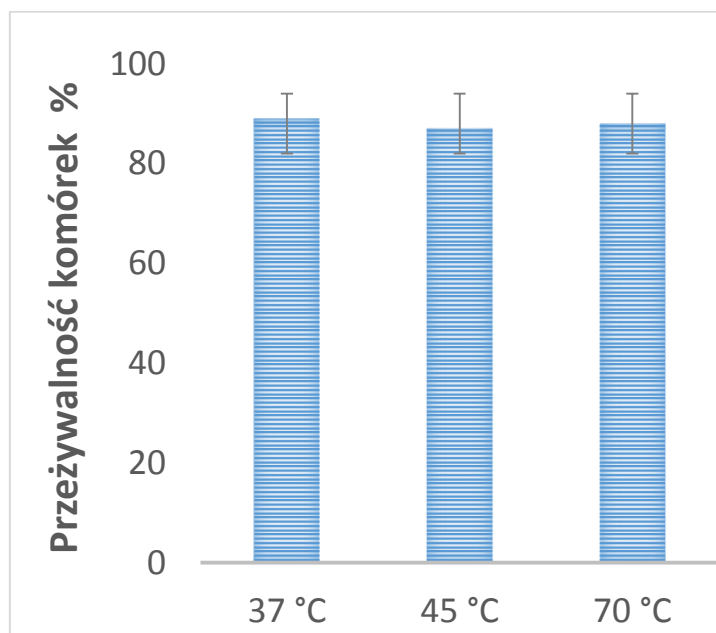
Analizując powyższe dane możemy wywnioskować, że w 37 °C kinetyka uwalniania Dox związana była z transportem dyfuzyjnym według Ficka. Przy podwyższonej temperaturze parametr ten spadł poniżej wartości 0,43 co oznaczało zmniejszoną dyfuzję Ficka (ang. *less Fickian diffusion*). Zmniejszenie wartości parametru n związane jest ze wzrostem polidispersyjności nanożeli, co wiąże się z procesem degradacji i dezintegracji sieci nanożelu. W pH 5,5 parametr n malał liniowo wraz ze wzrostem temperatury natomiast w pH 7,4 zmieniał się w postaci wykładniczej.

Porównując powyższe wyniki z tymi uzyskanymi dla nanożeli sieciowanych standardowym środkiem sieciującym BIS z wprowadzoną trzysegmentową hybrydą wartości parametru n uwalniania Dox były znacznie wyższe i miały charakter niedyfuzyjny.

9.2.7. Cytotoksyczność

Cytotoksyczność nanożeli oszacowano jak poprzednio za pomocą testu MTT. Wybrano linię komórkową raka trzustki Insulinoma β -TC3. Nanożele inkubowano w środowisku

komórek nowotworowych 72 godziny. Użyto zarówno nanożeli zawierających lek jak i również nienaładowane nośniki. Na rysunku 69 przedstawiono wyniki testu MTT dla nanożeli nie zawierających leku w trzech różnych temperaturach.



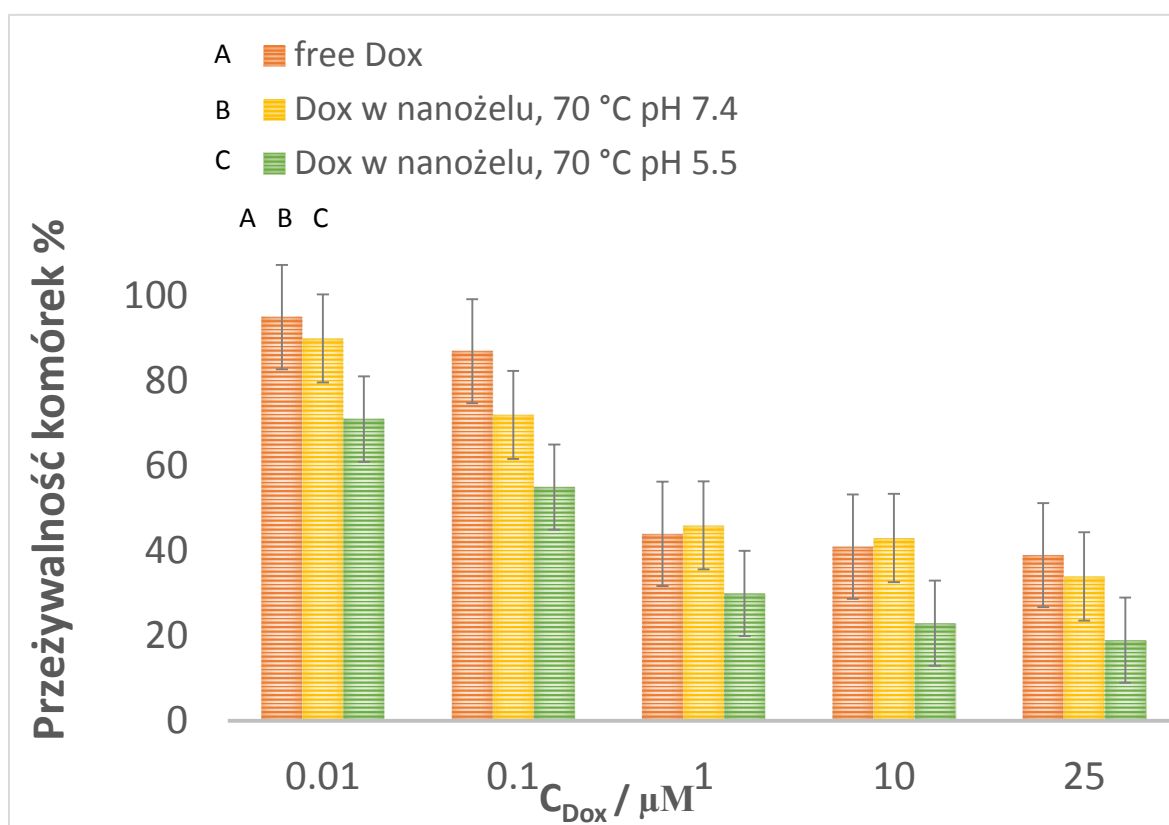
Rys. 69. Test MTT na komórkach Insulinoma β -TC3 dla nanożeli PNIPA-AAc-123cros niezawierających doksorubicyny po wcześniejszym podgrzaniu do 3 różnych temperatur.

Wyniki testu MTT sugerują, że nanożele PNIPA-AAc-123cros są biokompatybilne i sam nośnik nie powoduje istotnego niszczenia komórek nowotworowych. Ważny jest również fakt, że produkty temperaturowej degradacji nośników również nie wykazują istotnej cytotoksyczności (przeżywalność komórek pozostaje na wysokim poziomie).

Kolejny etapem badań było sprawdzenie skuteczności niszczenia komórek nowotworowych linii Insulinoma przez nanożele PNIPA-AAc-123corss naładowane doksorubicyną i porównanie otrzymanych wyników z wynikami dla doksorubicyny bez nośnika. Na rysunku 70 przedstawione są wyniki testu MTT dla nośników załadowanych Dox po 72 godzinach inkubacji w środowisku komórek nowotworowych. Nanożele były przed pomiarem podgrzewane do temperatury 70 °C w celu doprowadzenia do ich degradacji i do uwolnienia leku z nośnika. Zaobserwowałam wysoką skuteczność niszczenia komórek nowotworowych przez naładowane doksorubicyną nanożele PNIPA-AAc-123cros. Żywotność linii β -TC3 stopniowo zmniejszała się wraz ze wzrostem stężenia Dox w nanożelach. Efekt cytotoksyczności był wyższy w obniżonym pH. Dla najwyższych stężeń doksorubicyny zawartej w nanożelach w pH 5,5, przeżywalność komórek nowotworowych wynosiła zaledwie

20%. Cytotoksyczność dokсорubicyny uwalnianej z nośnika była silniejsza w stosunku do dokсорubicyny wolnej.

Obliczono również parametr IC₅₀ wskazujący, ile konkretnego leku jest potrzebne do zahamowania danego procesu biologicznego o połowę. Wartości tego parametru wyrażane są jako stężenia molowe. Parametr ten dla nanożeli PNIPA-AAc-oligo123cros podgrzanych do 70 °C wynosił odpowiednio $0,78 \pm 0,04 \mu\text{M}$; $0,37 \pm 0,03 \mu\text{M}$ dla pH 7,4 i 5,5. Natomiast dla wolnej dokсорubicyny $2,11 \pm 0,09 \mu\text{M}$ i $2,49 \pm 0,07 \mu\text{M}$ kolejno dla pH 7,4 i 5,5. Dla celów porównawczych wyznaczono również wartość IC₅₀ dla nanożeli PNIPA-AAc-oligo123cros traktowanych temperaturą 45 °C. Wartości te wynosiły odpowiednio $0,57 \pm 0,04 \mu\text{M}$ i $0,88 \pm 0,04 \mu\text{M}$ przy pH 5,5 i 7,4. Analiza parametru IC₅₀ wykazała, że cytotoksyczność linii komórkowej β -TC3 była osiągalna dla niższych stężeń w przypadku, kiedy nanożele ulegały degradacji (70 °C) i były to znacznie niższe stężenia Dox w porównaniu z lekiem bez zastosowania nośnika.



Rys. 70. Przeżywalność komórek raka trzustki Insulinoma po 72 h traktowaniu ich nanożelem sieciowanym za pomocą DNA naładowanym Dox w porównaniu do działania wolnej dokсорubicyny.

9.2.8. Podsumowanie

Powyższe wyniki badań udowadniają, że możliwa jest synteza nanożelu sieciowanego za pomocą trzysegmentowej hybrydy DNA bez użycia dodatkowych środków sieciujących.

Wprowadzając trzysegmentowe komplementarne odcinki DNA podczas syntezy nanożeli otrzymano sieć, która pozwoliła na dodatkowe sterowanie degradacją nanożeli pod wpływem warunków środowiskowych. Udowodniono, że odpowiednio wysoka temperatura (70 °C) powoduje nieodwracalne niszczenie sieci polimerowej poprzez denaturację podwójnej nici DNA. Jednak, gdy przyłożona zostanie nieco niższa temperatura degradacja nanożeli może mieć charakter częściowo odwracalny ze względu na proces renaturacji DNA.

Dzięki zastosowaniu sieciowania za pomocą odcinków DNA uzyskałam znacznie większą wydajność akumulacji leku niż w przypadku, gdy DNA było jedynie przyłączone do sieci polimerowej i nie pełniło roli środka sieciującego. Wnioskuje, że w tym przypadku DNA budowało wewnętrzną strukturę sieci polimerowej, przez co lek mógł w większym stopniu wiązać się wewnątrz nanocząstki.

Uwalnianie leku zachodziło według dwóch mechanizmów zależnych od temperatury: pierwszy związany był z lokalnymi zmianami konformacyjnymi i kurczeniem się sieci nanożelu natomiast drugi z bezpośrednią degradacją sieci polimerowej wskutek denaturacji DNA. Uzyskane wyniki doprowadziły do wniosków, że specyficzny proces akumulacji leku we wnętrzu nanożeli chroni aktywną formę leku i pozwala na uwolnienie leku pod wpływem specyficznych warunków środowiskowych takich jak: pH i temperatura. Jednocześnie denaturacja łączników DNA powodowała degradację sieci i ułatwiała wydalenie pozostałości po nośniku z organizmu. Udowodnione zostało, że zarówno nanożele jak i produkty ich temperaturowej degradacji były całkowicie bezpieczne dla organizmu. Testy cytotoksyczności na liniach komórkowych Insulinoma dla nośników z zakumulowaną dokсорubicyną wykazały niską przeżywalność komórek nowotworowych, która wynosiła zaledwie 20% w przypadku odpowiednio wysokich dawek Dox i obniżonego pH środowiska.

9.3. Nanożele z DNA zmodyfikowanym mostkami –S-S–

Ostatnim etapem moich badań była synteza nanożeli PNIPA-AAc modyfikowanych oligonukleotydami zawierającymi ugrupowania disiarczkowe pękające pod wpływem glutationu (GSH). Modyfikację sieci nanohydrożelu prowadziłam poprzez przyłączenie do głównego łańcucha polimeru nici DNA z ugrupowaniem PEG200. Do tej nici przyłączałam, wykorzystując proces hybrydyzacji, nić zawierającą mostki disiarczkowe. Tak samo jak w poprzednich syntezach utworzona podwójna helisa DNA stanowiła miejsce wiązania dokсорubicyny na zasadzie interkalacji. Uzyskane nanożele były czułe na trzy rodzaje bodźców: temperaturę, pH oraz obecność glutationu. Testowane było uwalnianie leku w warunkach

podwyższonego stężenia GSH, powodujące rozszczepienie podwójnej nici DNA a w rezultacie wydajniejsze uwalnianie zakumulowanego leku.

W kolejnych podrozdziałach zostanie dokładnie przybliżona idea syntezy, właściwości fizykochemiczne nanożeli, profile uwalniania leku oraz badania komórkowe pozwalające na określenie użyteczności tego typu nośników pod kątem uwalniania dokсорubicyny w środowisku komórek nowotworowych o zwiększonym stężeniu glutationu.

9.3.1. Synteza

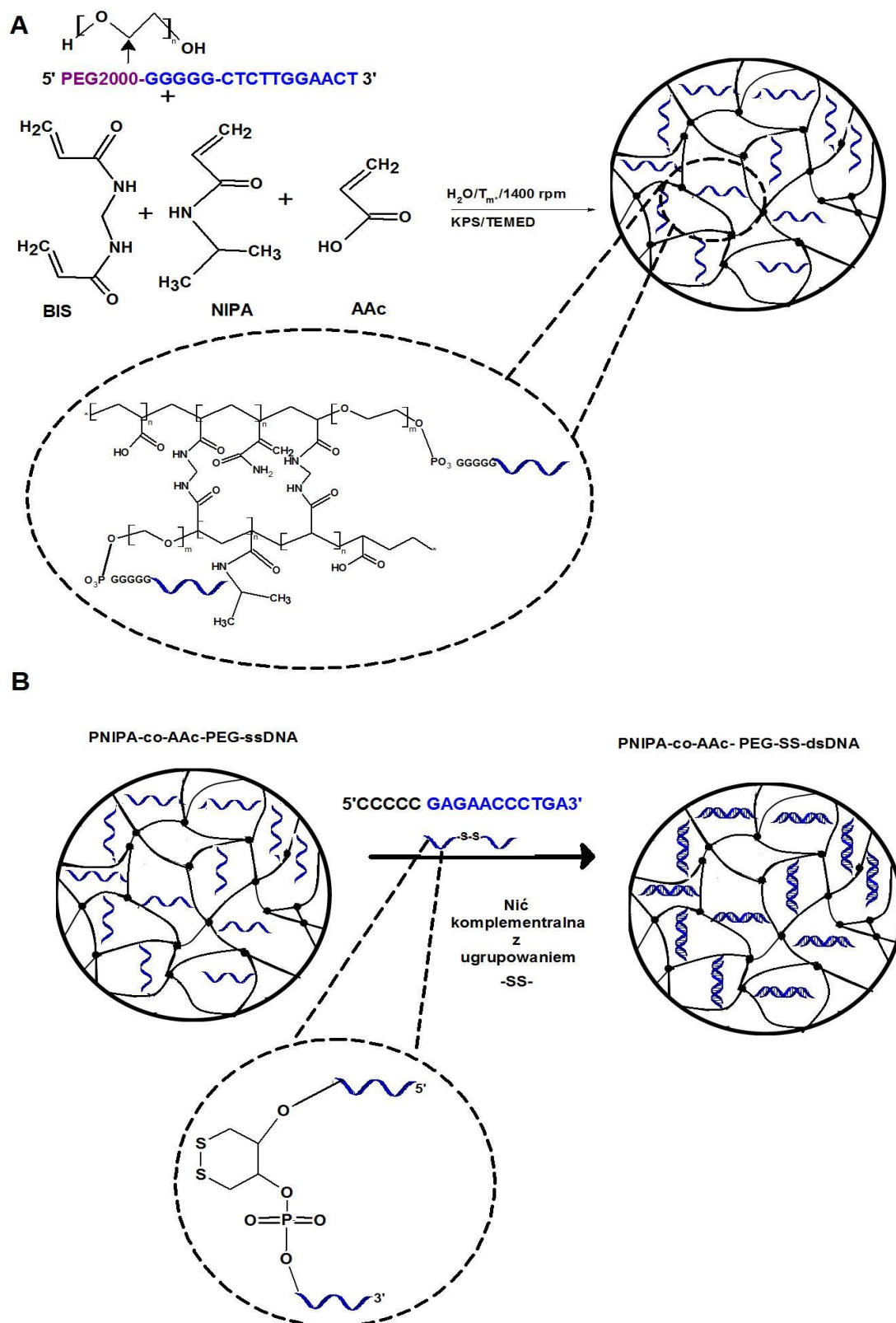
Nanożele zostały przygotowane w dwuetapowej syntezie, której schemat został przedstawiony na rysunku 71. Na początku zsyntezowano nanożele na bazie polimeru PNIPA i kwasu akrylowego zmodyfikowane jedną sekwencją oligonukleotydów. Proporcje użytych monomerów były identyczne jak w poprzednich syntezach, czyli całkowite stężenie monomerów wynosiło 75 mM w tym kwasu akrylowego 7,5 mM. Jako środka sieciującego użyto metylenobisakaryloamidu, którego zawartość wynosiła 2% w stosunku do wszystkich wprowadzonych monomerów. Syntezę prowadzono w łącznej objętości 10 ml.

Oligonukleotydy (oligo4) zostały przyłączone bezpośrednio do łańcucha głównego polimeru za pomocą ugrupowania PEG2000. Ten rodzaj syntezy nieco różnił się od poprzednich wykonanych w mojej pracy, gdzie DNA było przyłączane za pomocą grup akrylowych w łańcuchy boczne sieci polimerowej. Przygotowanie roztworu DNA zmodyfikowanego PEG2000 wyglądało następująco: 100 μ L DNA o stężeniu 100 μ mol/L rozpuszczono w 3 ml buforu fosforanowego o pH 7,4. Absorbancja roztworu wynosiła około 0,5. Roztwór oligonukleotydów dodano do roztworu monomerów. Całkowite stężenie DNA w roztworze przed syntezą wynosiło 3,45 μ mol/L.

Proces syntezy prowadzono analogicznie jak syntezy przedstawione w poprzednich rozdziałach. Reakcja polimeryzacji trwała 5 h. Następnie chłodzono otrzymany roztwór w temperaturze pokojowej przez 24h. Nanożele były oczyszczane przez dializę kontrolowaną konduktometrycznie.

Po oczyszczeniu przeprowadzono proces hybrydyzacji komplementarnego odcinka DNA z wbudowanymi mostkami disiarczkowymi (oligo5), patrz rys. 71 B. Roztwór nanożeli z wprowadzoną jedną nicią (PNIPA-AAc-PEG-oligo4) ogrzewano do temperatury 60° C w celu zwiększenia dostępności nici DNA poprzez skurczenie nanożelu i rozciągnięcie wprowadzonych oligonukleotydów. Wprowadzono nic komplementarną o stężeniu o 30% większym niż stężenie nici wprowadzonej do nanożelu. Nic komplementarna została rozpuszczona w buforze PBS zawierającym 0,15 M NaCl i 0,002 M KCl. Kolejno następowało: mieszanie i inkubacja w temperaturze pokojowej przez około 30 min i chłodzenie w łaźni

lodowej. Roztwór trzymano przez 24 h w niskiej temperaturze w celu dokończenia procesu hybrydacji. Stężenie finalne wprowadzonych oligonukleotydów zostało oznaczone spektrofotometrycznie. Wykonano również porównawczo hybryzację komplementarnego odcinka DNA nie zawierającego mostków disiarczkowych.

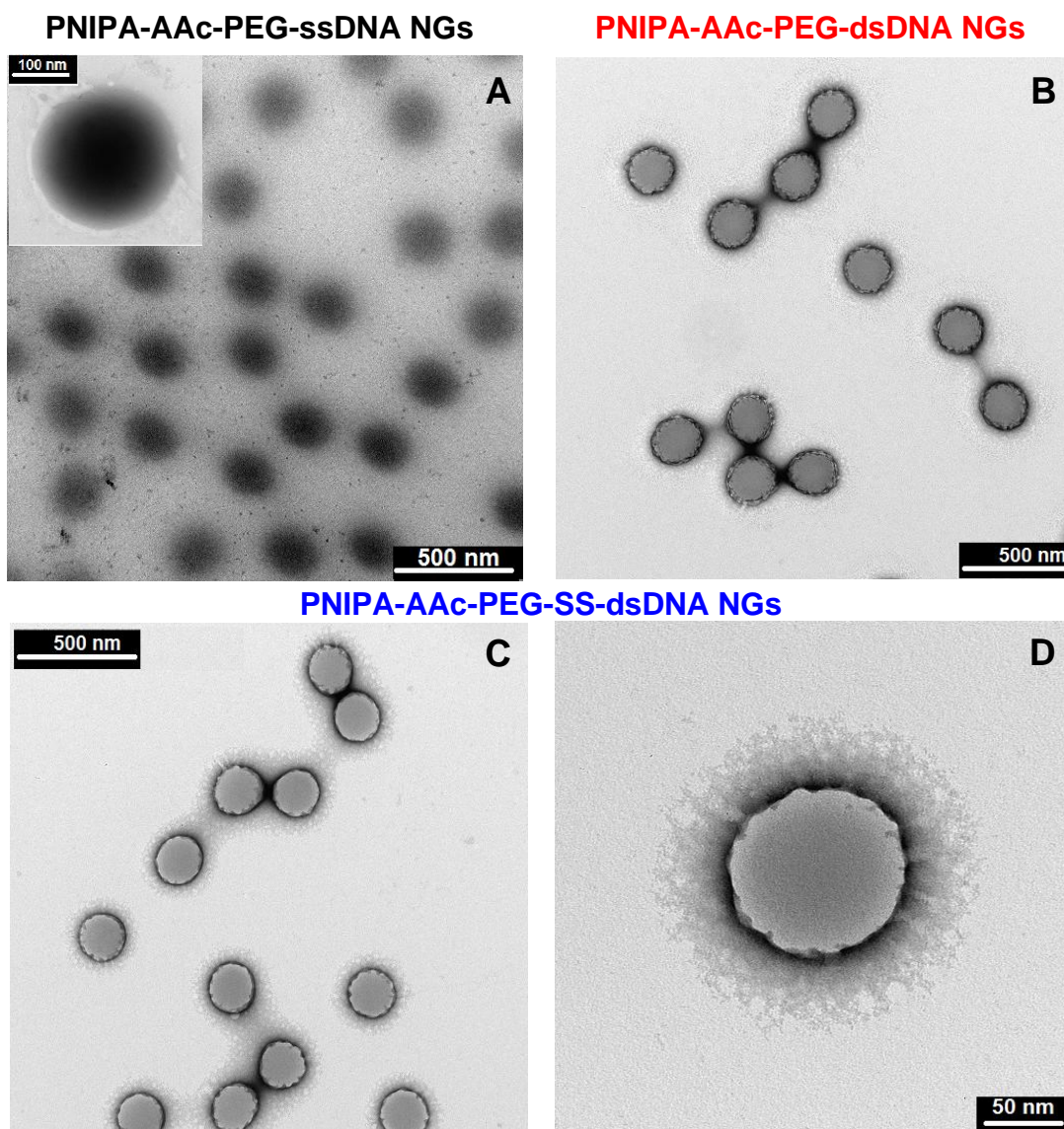


Rys. 71. Schemat dwuetapowej syntezy nanożeli PNIPAAc-AAc-PEG-SS-dsDNA.

9.3.2. Morfologia

Morfologię zsyntezowanych nanocząstek zbadalam za pomocą obrazowania TEM. Próbkę były kontrastowane 1% roztworem octanu uranylu. Jak wiadomo związek ten ma powinowactwo do ujemnie naładowanych grup fosforanowych obecnych w DNA. Na rysunku 72 przedstawione zostały mikroobrazy TEM dla nanożeli z pojedynczymi niciami, podwójnymi niciami oraz z niciami podwójnymi zawierającymi mostki disiarczkowe. Na rysunku 72 A można zaobserwować gładką powierzchnię nanożeli zawierających tylko jedną nić włączoną do sieci nanożelu. Nanożele te są mocno skontrastowane w całej objętości, co sugeruje, że DNA zostało równomiernie rozdystrybuowane wewnątrz nanocząstki. Natomiast nanożele z podwójnymi niciami DNA (rys 72 B) posiadały brzegi nanocząstki mniej skontrastowane. Sugeruje to, że po procesie hybrydyzacji, dsDNA skumulowało się na powierzchni nanożeli tworząc warstwę powierzchniową typu „shell”. Nanożele dsDNA zawierające mostki disiarczkowe (rys. 72 C i D) wykazywały również odchylenia od kulistego kształtu. Przypominały struktury typu słonecznego, gdzie DNA zakumulowane było na zewnątrz nanocząstki. Obrazy te sugerują, że po dołączeniu nici komplementarnej otrzymaliśmy strukturę gdzie nici DNA wystają poza obręb nanocząstki tworząc niezależną oligonukleotydową otoczkę nanożelu.

Rozmiary nanożeli odczytane z obrazów TEM przyjmują wartości około 150-200 nm. Należy podkreślić, że rozmiary te odpowiadają stanowi skurczonemu nanożeli. Dla obydwu rodzajów nanożeli zawierających podwójne nici DNA, po akumulacji doksorubicyny rozmiary wzrosły o około 10%.



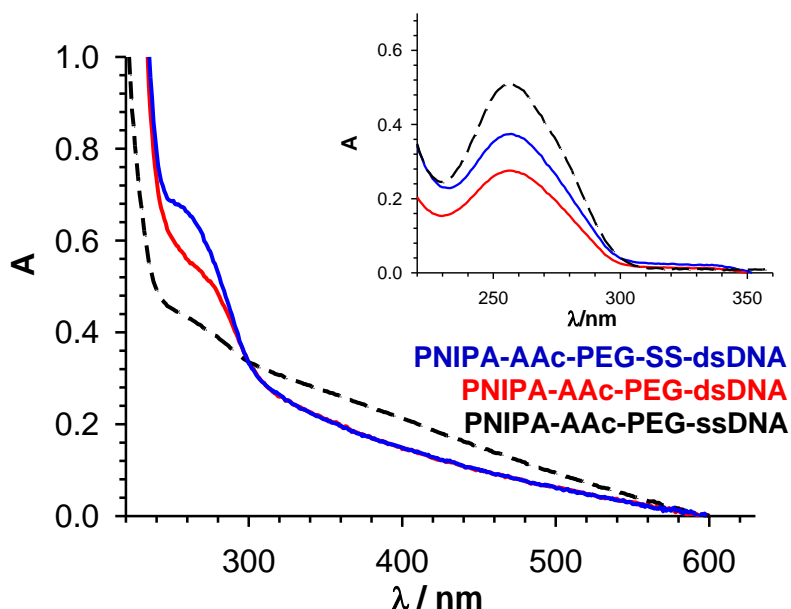
Rys 72. Obrazy TEM w temperaturze 25° C dla wysuszonych nanożeli (A) PNIPA-AAc-PEG-ssDNA-, (B) PNIPA-AAc-PEG-dsDNA-, (C, D) PNIPA-AAc-PEG-SS-dsDNA. Użyty środek kontrastujący to octan uranu (UA).

9.3.3. Analiza organizacji przestrzennej DNA w nanożelach

Obecność ssDNA (oligo4) w nanożelach oraz wydajność jego hybrydyzacji z komplementarnymi oligonukleotydami zawierającymi mostki-SS- (oligo5) i bez nich (oligo6) monitorowano za pomocą pomiarów UV-VIS, patrz rys. 73. Wszystkie pomiary wykonano po dializie i usunięciu niezwiązanych form DNA z roztworów nanożeli. Obserwowałam typowy sygnał pochodzący od dsDNA o maksimum długości fali przypadającym na 260 nm. Jak wiadomo z literatury, typowa zakończona hybrydyzacja dsDNA (konformacja B) powoduje podwójne obniżenie intensywności pasma oligonukleotydów ssDNA [263]. Aby obliczyć wydajność tej hybrydyzacji wyniki zmian absorbancji zostały porównane z absorbancją tych

samych odcinków w roztworze buforowym, patrz wykres wstawiony do rys. 73. Porównując skuteczność hybrydyzacji dsDNA dla oligonukleotydów rozpuszczonych w roztworze i prezentowanych w nanożelach, zauważono połowiczną wydajność hybrydyzacji dla hybryd zawierających mostki –SS–. Ponadto, nanożele z dsDNA zawierającymi mostki-SS- dały nieco wyższą wartość absorbancji niż niezmodyfikowane hybrydy dsDNA. Związane było to z tym, że możliwa była hybrydyzacja typowa 1:1 i hybrydyzacja połowiczna tworząca dodatkową zewnętrzną sieć składającą się z DNA. Lepsza widoczność hybryd dsDNA na widmach UV-VIS jest wynikiem korelacji między specyficznymi efektami występującymi w sieciach nanożeli. Są to: a) zwiększenie klarowności roztworów nanożeli po hybrydyzacji związane z większym powinowactwem do wody cząsteczek dsDNA, b) lepszą dostępnością cząsteczek dsDNA do wykrywania przez UV-VIS ze względu na ich ekspozycję na powierzchni nanożelu.

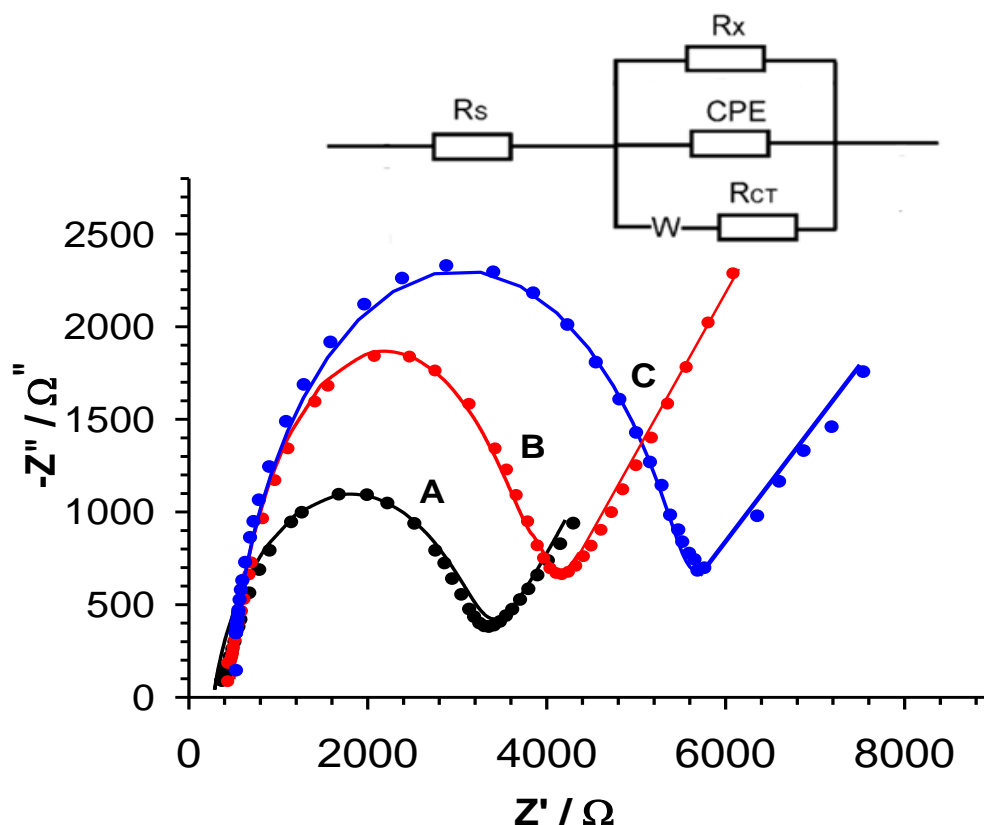
Bazując na porównaniu absorbancji hybryd DNA rozpuszczonych w roztworze i tych obecnych w nanożelach, mogłam oszacować wydajność procesu hybrydyzacji DNA. Wyniósł on odpowiednio 76,9 i 85,3% dla PNIPA-AAc-PEG-dsDNA i PNIDA-AAc-PEG-SS-dsDNA. Taka stosunkowo niewielka różnica wydajności hybrydyzacji prowadzi do wniosku, że główne różnice w widmie UV-Vis dla PNIPA-AAc-PEG-dsDNA i PNIPA-AAc-PEG-SS-dsDNA odpowiadają różnym układom przestrzennym dsDNA w poszczególnych sieciach; co nie wyklucza również istnienia odmiennych postaci dsDNA.



Rys. 73. Widma UV-Vis dsDNA ($\lambda=260$) wprowadzonego do nanożelu po procesie hybrydyzacji w PNIPA-AAc-PEG-dsDNA (czerwona linia) i PNIPA-AAc-PEG-SS-dsDNA (niebieska linia). Jako odniesienie podano absorbancję (przerywana czarna linia) dla nanożeli z pojedynczą nicią PNIPA-AAc-PEG-ssDNA. Rysunek wstawiony: typowy proces hybrydyzacji oligonukleotydów w roztworze 0,1 M PBS o pH 7,4.

Bardziej dokładną charakterystykę procesu hybrydyzacji w badanych nanożelach przeprowadzono z użyciem techniki elektrochemicznej spektroskopii impedancyjnej. Typowe widmo EIS dla badanych nanożeli jest przedstawione na rys. 74. Parametry EIS pozwalające wnioskować o strukturze DNA oszacowano dla warstw DNA nakropionych bezpośrednio na powierzchnię elektrod GC. Do opisu zjawisk zachodzących w DNA zaproponowano zmodyfikowany obwód zastępczy Randlesa, patrz wstawka do rys. 74. Zaproponowany obwód zastępczy składa się z R_s - oporu elektrolitu, R_{CT} - oporu przenoszenia elektronu, CPE - pojemności warstwy podwójnej, W- impedancji Warburga związanej z przeniesieniem masy na elektrodę oraz dodatkowego oporu równoległego R_x . Wprowadzenie dodatkowego oporu równoległego R_x poprawiło dopasowanie widm obliczonych teoretycznie do danych eksperymentalnych.

Widma EIS zostały wykonane przy użyciu jako układu red-ox równomolowej mieszaniny żelazo- i żelazicyjanków $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$. Obecność ujemnie naładowanego szkieletu fosforanowego warstwy tworzącej dsDNA utrudniała proces redukcji ujemnie naładowanych jonów. Wszystkie widma zawierały półkole i element liniowy. Ciekawym efektem było zwiększenie wartości R_{ct} (szerokość półkola) dla nanożeli zawierających mostki disiarczkowe w porównaniu do typowej hybrydyzacji zachodzącej w nanożelach PNIPA-AAc-PEG-dsDNA. Można to tłumaczyć poprzez nałożenie się na siebie dwóch efektów: a) większej wydajności hybrydyzacji dla nanożeli z oligonukleotydami modyfikowanym -SS- b) korzystniejszej ekspozycji dwuniciowych form -SS-dsDNA na powierzchni nanożelu. Patrząc na pozostałe parametry EIS, R_s miało podobne wartości dla wszystkich pomiarów i było niezależne od długości hybrydyzacji oligonukleotydów. Parametr Warburga był prawie stały, a więc transport próbnika redoks w warstwie nanożelu do elektrody nie był utrudniony. Natomiast pojemność warstwy podwójnej (CPE) zmniejszała się wraz ze wzrostem długości dupleksu i wprowadzeniem mostków -SS-. Ciekawym efektem było to, że dodatkowa oporność R_x wzrosła dla dsDNA w porównaniu z ssDNA, ale zmniejszyła się dla nanożeli PNIPA-AAc-PEG-SS-dsDNA. Wynik ten można interpretować tym, że ułożenie przestrzenne struktur dsDNA zawierających mostki disiarczkowe różniło się nieco od ułożenia nanożeli bez wiązań -SS- [264, 265].



Rys. 74. Widma EIS dla A) PNIPA-AAc-PEG-ssDNA- (czarne punkty), B) PNIPA-AAc-PEG dsDNA (czerwone punkty) i C) PNIPA-AAc-PEG-SS dsDNA (niebieskie punkty), $T = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Zastępczy obwód elektryczny: zmodyfikowany obwód Randlesa wykorzystywany do dopasowania symulowanych danych do danych eksperymentalnych. R_s - oporność roztworu, R_x - oporność dodatkowa, R_{CT} - opór przeniesienia ładunku, CPE – pojemnościowy element stałofazowy, W - impedancja Warburga.

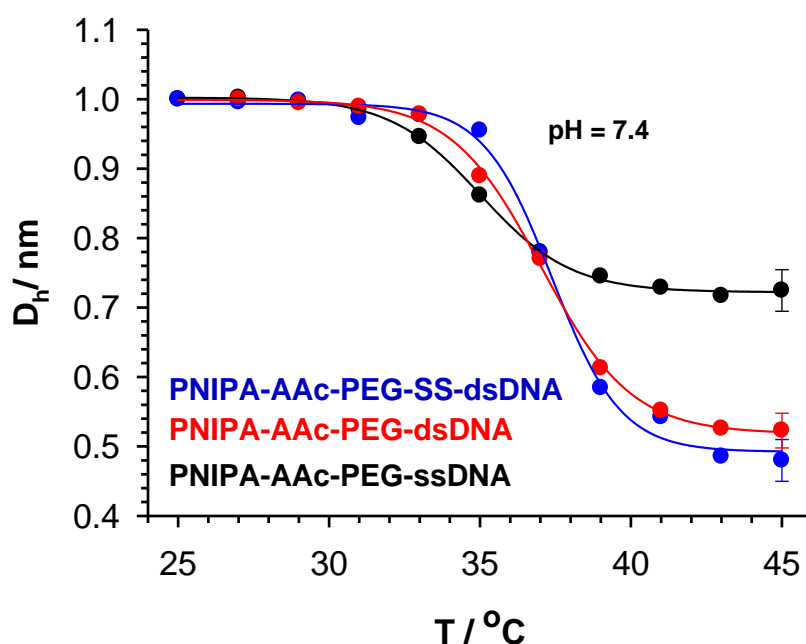
9.3.4. Analiza rozmiaru cząstek i potencjału zeta

Rozmiar cząstek oraz potencjał zeta został zmierzony za pomocą techniki dynamicznego rozpraszania światła. W tabeli 14 przedstawiono zestawienie średnich rozmiarów oraz wartości potencjałów zeta nanożeli zmodyfikowanych DNA w warunkach: a) temperatury pokojowej: $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, pH 7,4 lub 5,0), b) fizjologicznych: $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, pH 7,4, c) charakterystycznych dla komórek nowotworowych: 37°C , pH 5,0, d) terapii hipertermicznej nowotworów: $45\text{ }^{\circ}\text{C}$, pH 7,4 lub 5,0.

Typ nanożelu	PNIPA-AAc-PEG-ssDNA	PNIPA-AAc-PEG-dsDNA	PNIPA-AAc-PEG-SS-dsDNA
Rozmiar [D_h, nm] w pH 7,4			
D_h / 25 °C	428,7 ± 6,2	381,6 ± 9,8	341,0 ± 8,1
D_h / 37 °C	301,5 ± 7,5	251,0 ± 8,5	231,0 ± 9,5
D_h / 45 °C	283,2 ± 4,8	170,5 ± 4,7	155,0 ± 7,5
Rozmiar [D_h, nm] w pH 5,5			
D_h / 25 °C	375,2 ± 5,1	327,0 ± 8,5	327,5 ± 7,1
D_h / 37 °C	285,5 ± 7,3	153,4 ± 7,7	105,5 ± 9,2
D_h / 45 °C	197,9 ± 5,2	143,6 ± 6,9	98,5 ± 6,7
Potencjał zeta [ζ, mV] w pH 7,4			
ζ / 25 °C	-14,9 ± 1,6	-16,6 ± 1,5	-18,3 ± 1,2
ζ / 37 °C	-16,8 ± 1,1	-19,7 ± 1,4	-21,4 ± 1,5
ζ / 45 °C	-20,6 ± 1,4	-21,6 ± 1,7	-24,0 ± 1,3
Potencjał zeta [ζ, mV] w pH 5,5			
ζ / 25 °C	-5,9 ± 1,7	-9,6 ± 1,1	-11,5 ± 1,2
ζ / 37 °C	-13,2 ± 1,5	-15,6 ± 1,3	-18,2 ± 1,4
ζ / 45 °C	-19,5 ± 1,2	-21,2 ± 1,6	-23,5 ± 1,7

Tabela 14. Zestawienie rozmiarów (D_h) oraz wartości potencjałów zeta dla poszczególnych nanożeli w temperaturach 25/37/45°C oraz pH 5,5 i 7,4.

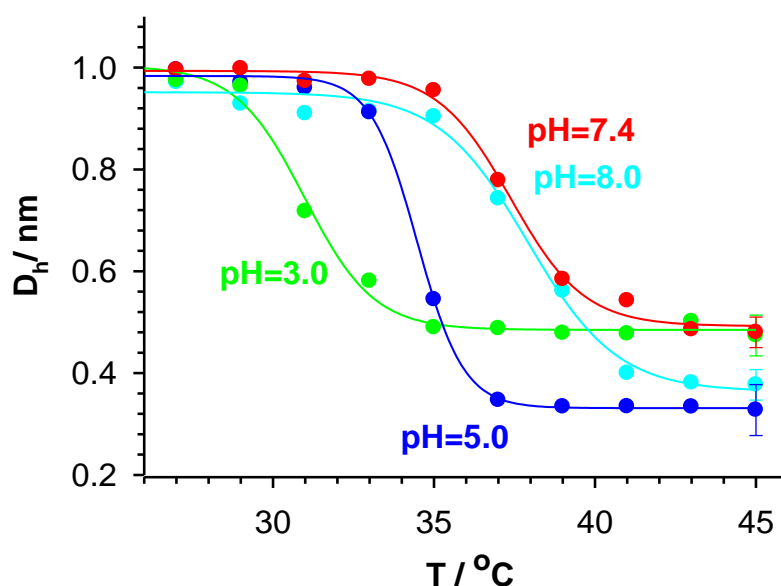
Na rysunku 75 zostały przedstawione znormalizowane ($T = 25^\circ\text{C}$) zależności promienia hydrodynamicznego nanożeli od temperatury. Początkowe rozmiary nanożeli zawierających podwójną nić DNA były o około 20% niższe niż dla nanożeli zawierających pojedyncze nici DNA. Nanożel zawierający tylko pojedyncze nici DNA w temperaturze fizjologicznej występował w postaci całkowicie skurczonej. Po procesie hybrydyzacji temperatura przejścia fazowego (LCST) przesunęła się w kierunku wyższych wartości. Natomiast zakres kurczenia się nanożeli pod wpływem temperatury był większy i występował w węższym zakresie temperatur dla nanożeli PNIPA-AAc-PEG-SS-dsDNA. Pomiedzy temperaturą fizjologiczną a temperaturą hipertermii następowało jeszcze nieznaczne kurczenie się nanożelu. Takie zachowanie było obiecujące z punktu widzenia dodatkowego sterowania uwalnianiem leku w podwyższonej temperaturze.



Rys. 75. Zależność promienia hydrodynamicznego, D_h , znormalizowanego vs. D_h w 25° C, od temperatury dla PNIPAAc-PEG-ssDNA- (czarna linia), PNIPAAc-PEG-dsDNA (czerwona linia) i PNIPAAc-PEG-SS-dsDNA (niebieska linia).

Zmiany warunków środowiska nanożeli korelowały ściśle z następującymi zmianami rozmiaru. Po przejściu z pH obojętnego do bardziej kwaśnego obserwowaliśmy dodatkowe kurczenie się nanożeli modyfikowanych dsDNA oraz zmianę potencjału zeta w kierunku bardziej ujemnych wartości. Oba efekty wskazują na dynamiczną reorganizację i lepszą ekspozycję hybryd DNA w zewnętrznych sferach badanych nanożeli. Można nawet powiedzieć, że zsyntezowane nanożele posiadają polimerowy rdzeń i powłokę opartą na DNA.

Wpływ pH na przemianę fazową nanożeli zawierających dsDNA z mostkami disiarczkowymi został przedstawiony na rysunku 76. Na zamieszczonych wykresach można zaobserwować, że w zasadowym pH promienie hydrodynamiczne nanożeli, przed przemianą fazową, przyjmowały większe wartości. Związane to było z deprotonacją grup karboksylowych w sieci oraz grup fosforanowych obecnych w nici DNA. Ważnym efektem świadczącym o czułości badanych nanożeli na pH jest fakt, że temperatura przejścia fazowego rosła wraz ze wzrostem pH. W fizjologicznym pH (pH = 7,4) VPT występowała w pobliżu temperatury fizjologicznej (37° C). Wyniki te potwierdzają użyteczność nanożeli PNIPAAc-PEG-SS-dsDNA z tytułu istotnie zwiększonego uwalniania leku dopiero w komórkach nowotworowych (pH 5,0).



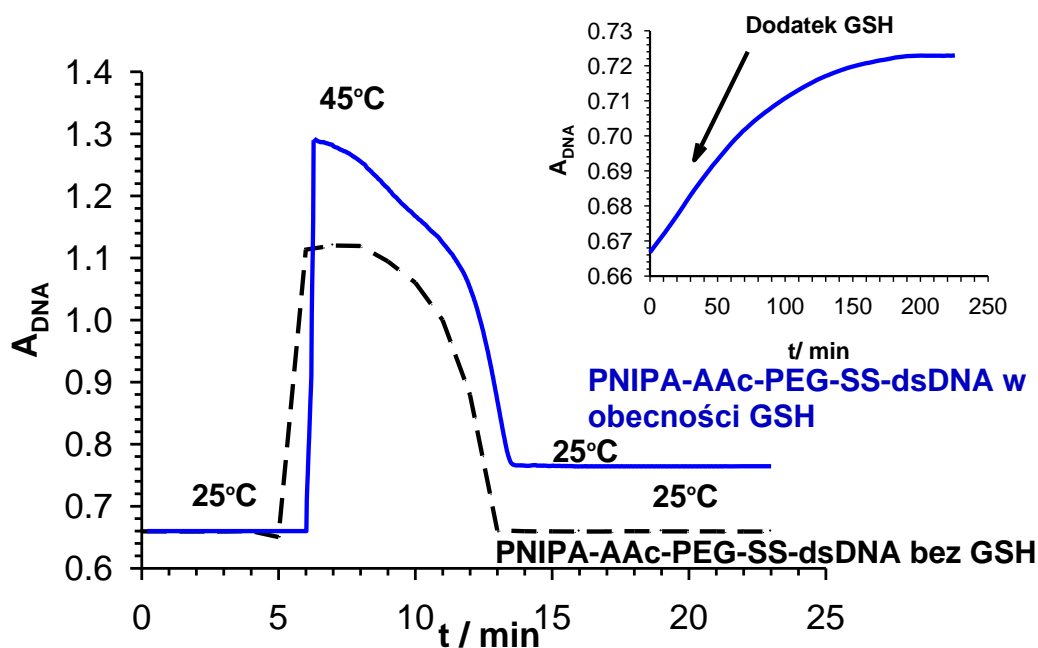
Rys.76. Wykresy promienia hydrodynamicznego, D_h , znormalizowanego vs. D_h w 25° C, dla nanożeli PNIPA-AAc-PEG-SS-dsDNA w różnych pH.

9.3.5. Analiza wpływu GSH na degradację nanożeli

Według wstępnych założeń nanożele PNIPA-AAc-PEG-SS-dsDNA zawierające ugrupowania redoks powinny być wrażliwe na wpływ glutationu. Zakładałam, że nić DNA zawierająca mostki disiarczkowe będzie ulegała denaturacji pod wpływem wysokiego stężenia glutationu (10 mM) z jednoczesnym uwolnieniem leku. Jak wiadomo w komórkach nowotworowych obserwuje się wyższe stężenie glutationu, niż w komórkach zdrowych, co pozwoliłoby na uwalnianie leku bezpośrednio w miejscu docelowym.

Aby ocenić wpływ glutationu na zmiany zachodzące w DNA przeprowadzono prosty eksperyment przy użyciu spektroskopii UV-VIS. Na rysunku 77 przedstawiono zmiany absorbancji po dodatku glutationu do roztworu nanożeli. Przez proste porównanie początkowej absorbancji dla nanożeli zawierających mostki –SS– w podwyższonej temperaturze i tej po dodatku GSH, zauważyliśmy, że dodanie GSH wiąże się z częściową dezintegracją sieci nanożelu. Doświadczenie polegało na jednoczesnym ogrzewaniu próbki do temperatury hipertermii wraz z dodatkiem GSH, a następnie chłodzeniu próbki. Dla porównania prowadzono ten sam eksperyment bez obecności glutationu. Można zauważyć, że po jednoczesnym grzaniu próbki oraz dodatku glutationu absorbancja nanożeli nie wraca do swojej początkowej wartości. Natomiast w warunkach gdzie jedynie ogrzewano próbkę absorbancja wraca do swojej początkowej wartości. Te wyniki sugerują, że jednoczesne ogrzewanie z dodatkiem GSH powoduje denaturację podwójnej nici DNA w nanożelu, co skutkuje większą widocznością nici i w konsekwencji wyższą wartością absorbancji. W kolejnym porównaniu

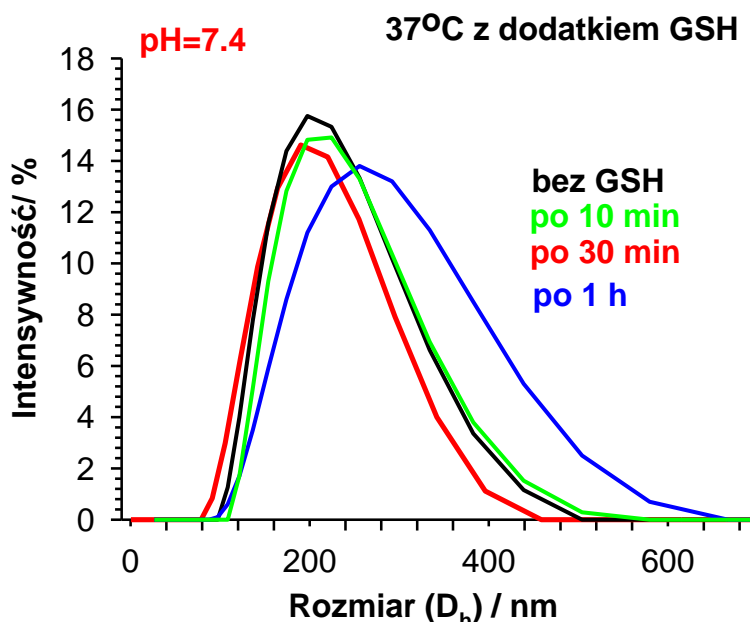
na rysunku wstawionym przedstawiono zmiany absorbancji po dodatku GSH w temperaturze pokojowej. Można zauważyć delikatny wzrost absorbancji, jednak nie jest on znaczący. Przedstawione wyniki sugerują, że DNA zawarte w sieci nanożeli ulega nieodwracalnej denaturacji w warunkach obecności dwóch czynników: wzrostu temperatury i glutationu. Przedstawione wyniki wskazują, że zsyntezowane nanożele mogą być użyte do uwalniania substancji leczniczej w warunkach hipertermicznych w środowisku komórek nowotworowych o zwiększonym stężeniu GSH.



Rys. 77. Zmiany absorbancji ($\lambda = 260$ nm) zmierzone w układzie trzech punktów temperaturowych (25 °C do 45 °C i z powrotem do 25 °C) w obecności GSH (niebieska linia) i bez dodatku GSH (linia czarna). Rysunek wstawiony: Zmiany absorbancji po dodatku GSH w 25 °C.

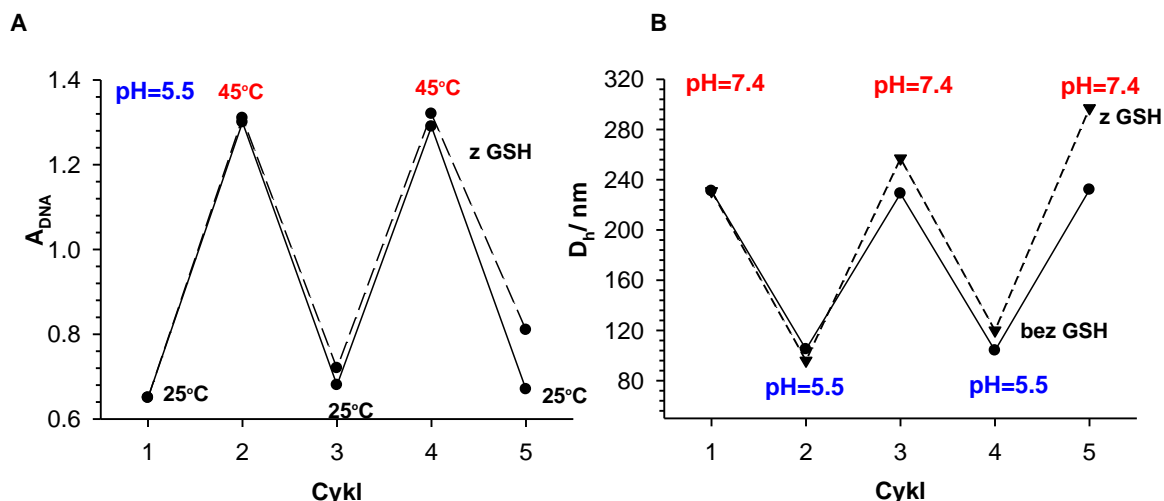
Dezintegrację nanożeli pod wpływem GSH badano również za pomocą techniki dynamicznego rozpraszania światła, patrz rysunek 78. Promień hydrodynamiczny nanożeli analizowano po dodaniu 10 mM roztworu glutationu w czasie trwania procesu uwalniania. Wielkość nanożeli wzrosła w czasie dzięki rozluźnieniu sieci polimerowej spowodowanym dwoma procesami: protonowaniem wiązania -SS- i zmianami konformacyjnymi w DNA (denaturacja nici). Po godzinnej ekspozycji nanożeli na działanie glutationu rozkład wielkości znacznie się powiększył. Sugeruje to stopniową degradację nici a zarazem powierzchniowej struktury nanożelu. W przeciwieństwie do nanożeli sieciowanych za pomocą trzysegmentowej hybrydy DNA przedstawionych w rozdziale 9.2, nie następowała tutaj całkowita degradacja, lecz stopniowa dezintegracja warstwy powierzchniowej składającej się z DNA. Różnicę tą widać analizując zmianę rozmiaru techniką DLS. W przypadku żeli sieciowanych za pomocą

DNA następowało drastyczne obniżenie rozmiaru cząstek. Natomiast w przypadku omawianych tutaj nanożeli obserwowałam pewien wzrost wartości promienia hydrodynamicznego i wzrost polidispersyjności.



Rys. 78. Zmiany rozkładu wielkości DLS zarejestrowane dla nanożeli PNIPA-AAc-PEG-SS-dsDNA po dodaniu 10 mM GSH, pH 7,4, temperatura 37 °C.

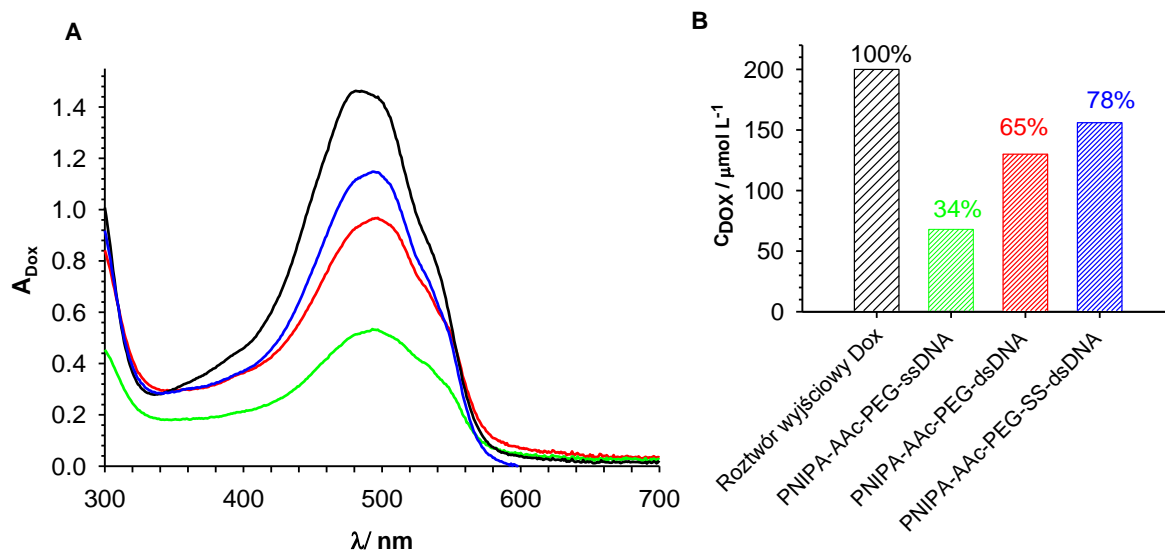
Rysunek 79 przedstawia zmiany absorbancji oraz promienia hydrodynamicznego podczas cykli grzania i chłodzenia nanożeli od temperatury pokojowej (25 °C) do temperatury hipertermii (45 °C) i z powrotem. Na rysunku 79 A można zaobserwować, że w cyklach grzania i chłodzenia w warunkach obniżonego pH z dodatkiem glutationu, po kilku cyklach następuje wzrost wartości absorbancji. Zmiany te sugerują, że lekko kwaśne pH wpływa dodatkowo na denaturację nici DNA obecnej w nanożelu. Natomiast na rysunku 79 B pokazane są zmiany promienia hydrodynamicznego w cyklach gdzie zmianie ulegało pH środowiska nanożeli (od pH 7,4 do pH 5,5). Można zaobserwować, że w obecności glutationu cykle te nie są odwracalne. Następuje wzrost rozmiaru nanożeli sugerujący dezintegrację sieci.



Rys. 79. (A) Zmiany absorbancji w trójpunktowym układzie temperatury (25 °C do 45 °C i z powrotem do 25 °C) względem obecności i nieobecności 10 mM GSH w pH 5,5. (B) Zmiany rozmiaru nanożeli pod wpływem zmiany pH (od 7,4 do 5,5 i z powrotem do 7,4) w obecności i nieobecności 10 mM GSH.

9.3.6. Badanie akumulacji i uwalniania leku

Wydajność akumulacji interkalatora Dox w nanożelach została oszacowana za pomocą techniki UV-VIS. Badano pik pochodzący od Dox bezpośrednio w nanożelach po odwirowaniu i oddzieleniu niezakumulowanego leku. Na rysunku 80 A przedstawiono porównanie absorbancji dokсорubicyny zakumulowanej w trzech rodzajach nanożeli: PNIPA-AAc-PEG-ssDNA-, PNIPA-AAc-PEG-dsDNA i PNIPA-AAc-PEG-SS-dsDNA. Akumulację prowadzono stosując początkowe stężenie Dox równe 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Natomiast stężenie poszczególnych nanożeli przed akumulacją wynosiło 0,0078 mg L^{-1} . Na rysunku 80 B ukazany został diagram procentowej zawartości Dox w poszczególnych nanożelach w stosunku do wartości początkowej. Najwyższą wartość akumulacji uzyskano dla nanożeli zawierających mostki disiarczkowe i wynosiła ona 78%. Kolejno dla nanożeli z podwójną i pojedynczą nicią DNA uzyskano odpowiednio 65% i 34%. Na wzrost akumulacji w nanożelach wpływała bezpośrednio obecność podwójnej nici DNA (oddziaływania interkalacji) oraz wprowadzenie mostków -SS-. Porównując z wynikami dla poprzednich nanożeli sieciowanych trzysegmentową hybrydą DNA: wówczas procent akumulacji Dox był wyższy (84%). Jednakże, początkowe stężenie Dox było niższe o połowę, a więc w rezultacie otrzymane nanożele z grupami -SS- posiadały największą ilość zakumulowanej Dox ze wszystkich zsyntezowanych przeze mnie nanożeli.

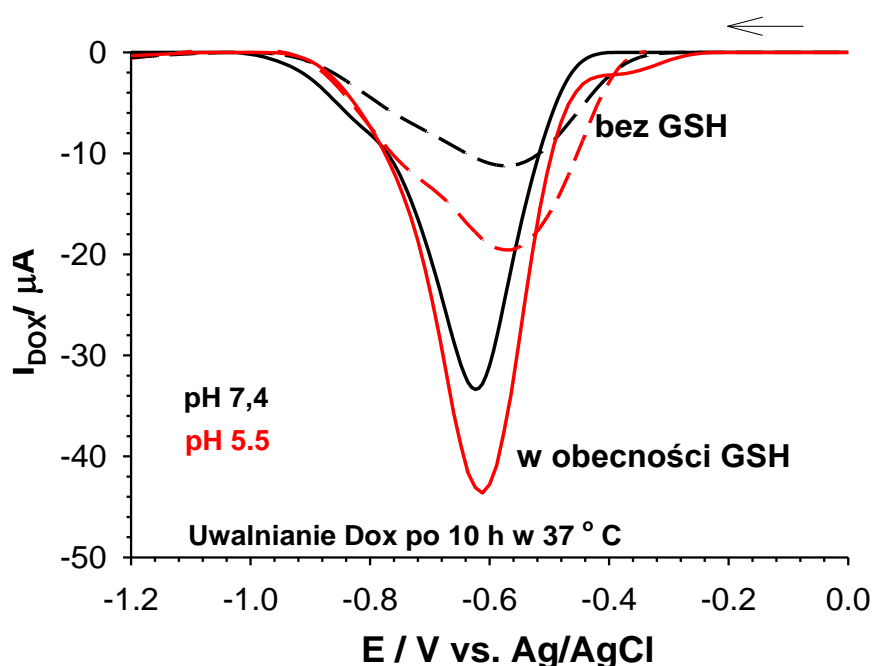


Rys. 80. Absorbancja ($\lambda = 485 \text{ nm}$) doksorubicyny w nanożelach: PNIPA-AAc-PEG-ssDNA (zielona linia), PNIPA-AAc-PEG-ssDNA (czerwona linia), PNIPA-AAc-PEG-SS-dsDNA (niebieska linia). Rysunek wstawiony: akumulacja (%) oraz stężenia Dox ($\mu\text{mol L}^{-1}$) w poszczególnych nanożelach.

Kolejnym etapem badań było oszacowanie udziału poszczególnych rodzajów wiązania Dox w nanożelach. Dwa znane główne sposoby wiązania Dox z DNA to: a) elektrostatyczne wiązanie dodatnio naładowanych cząsteczek do ujemnie naładowanych grup fosforanowych, oraz b) interkalacja między płaskimi zasadami. Przy różnych stosunkach stężenia Dox/DNA i różnych początkowych strukturach DNA, zwykle preferowane jest jedno z powyższych miejsc wiążących DNA [28]. Dox ma również bardzo wysokie powinowactwo wiązania do białek zawierających ugrupowania -SS-. Do analizy wiązań zastosowano model McGhee i von Hippel'a, który został dokładnie przybliżony w poprzednich rozdziałach.

W przypadku napęczniałych nanożeli PNIPA-AAc-PEG-SS-dsDNA zawierających mostki disiarczkowe, wartości stałych wiązania wyznaczone w 25 °C dla interkalacji (K_1 i n_1) i elektrostatycznych przyciągań (K_2 i n_2) były równe: $K_1 = (1,52 \pm 0,02) \cdot 10^4$, $n_1 = 2,11 \pm 0,01$; $K_2 = (0,78 \pm 0,01) \cdot 10^4$, $n_2 = 3,42 \pm 0,03$. Z uzyskanych wyników można wywnioskować, że oddziaływania typu interkalacyjnego są mocniejsze w porównaniu do oddziaływań elektrostatycznych. Jednak w porównaniu do wyników nanożeli sieciowanych za pomocą trzysegmentowej hybrydy DNA, K_1 i n_1 wykazują znacznie niższe wartości, co może być związane z obecnością nieco krótszych fragmentów DNA w strukturze wewnętrznej. Z kolei porównując oddziaływania elektrostatyczne, ich wartość aktualna jest znacznie wyższa niż w poprzednim przypadku.

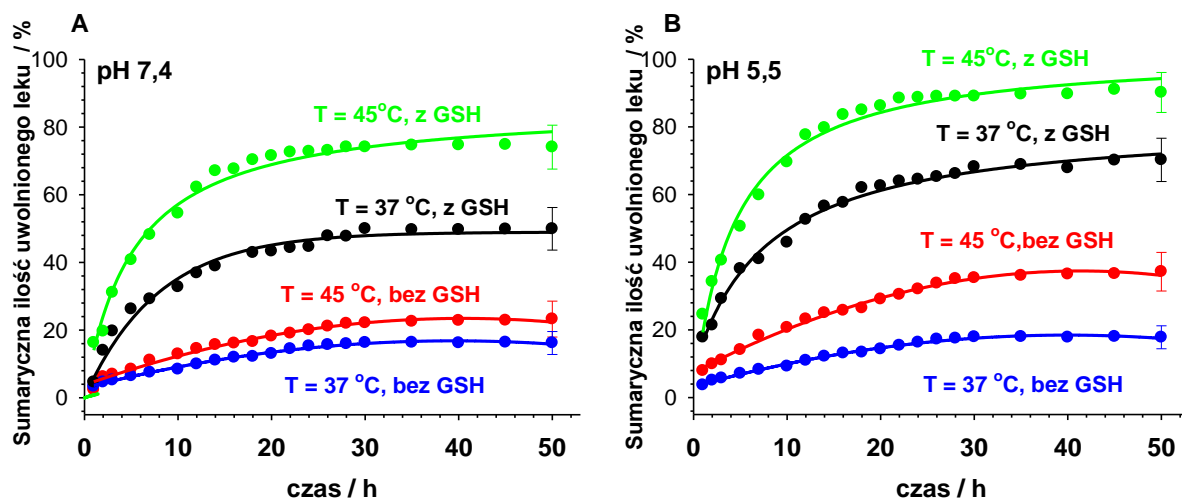
Uwalnianie Dox z nanożeli PNIPA-AAc-PEG-SS-dsDNA w poszczególnych temperaturach i pH oraz w obecności GSH rejestrowano za pomocą woltamperometrii fali prostokątnej (SWV). Na rysunku 81 został przedstawiony przykładowy woltamperogram SW zarejestrowany dla Dox uwolnionej z nanożeli po 10 h w obecności lub nieobecności GSH. Można zauważyć wyraźnie większe wartości prądów uzyskane przy uwalnianiu Dox w obecności glutationu. Dodatkowo widzimy również, że obniżone pH generuje również nieco wyższe prądy niż w przypadku pH fizjologicznego.



Rys. 81. Typowe sygnały SWV dla Dox uzyskane po 10 godzinach uwalniania w pH 7,4 i pH 5,5 w obecności i nieobecności GSH.

Na rysunkach. 82 A i 82 B przedstawione zostały profile uwalniania dokсорubicyny dla nanożeli modyfikowanych DNA z mostkami disiarczkowymi. Lek był uwalniany w zarówno w warunkach zbliżonych do środowiska komórek zdrowych (pH = 7,4) jak i nowotworowych (pH = 5,5) z zastosowaniem lub bez środka redukującego GSH. Wybrano dwie temperatury: fizjologiczną ($T = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$) i rutynowej hipertermii ($T = 45\text{ }^{\circ}\text{C}$). W temperaturze fizjologicznej, gdzie nie ma znaczących zmian strukturalnych DNA, proces uwalniania Dox był podobny dla obu wartości pH, a ilość uwolnionego leku osiągnęła 20%. W temperaturze $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ zmiany konformacyjne dsDNA mogły powodować wzrost procesu uwalniania Dox w nanożelach. Na tym etapie proces uwalniania był nieznacznie zależny od pH, a ilość uwolnionego leku wynosiła 20-30%. Dodanie GSH znacznie poprawiło skuteczność uwalniania Dox. Najlepsze wyniki uwalniania Dox uzyskano podczas łączenia hipertermii i obecności GSH. Ilość uwolnionego

leku w ten sposób osiągnęła 78 i 95% w stosunku do ilości wprowadzonej odpowiednio w pH 7,4 i 5,5.



Rys. 82. Kinetyka uwalniania Dox z nanożeli PNIPA-AAc-PEG-SS-dsDNA pod wpływem działania temperatury oraz GSH. (A) w pH fizjologicznym, (B) w pH komórek nowotworowych.

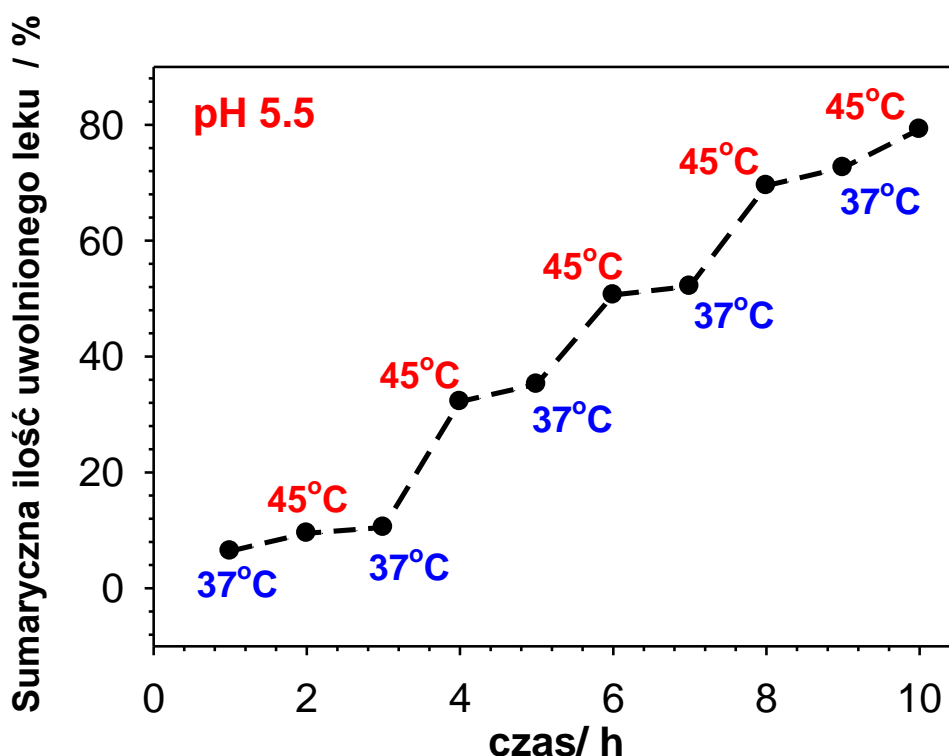
Proces uwalniania Dox z nanożeli analizowano za pomocą modelu Korsmeyera-Peppasa. W tabeli 15 zebrano parametry n oraz k obliczone według tego modelu.

Temperatura	Parametry uwalniania Dox		
	k	n	R
	Bez GSH w pH 5,5		
37 °C	4,081±0,3	0,410±0,2	0,9947
45 °C	8,387±0,5	0,605±0,2	0,9945
	Bez GSH w pH 5,5		
	k	n	R
	Bez GSH w pH 5,5		
37 °C	23,077±1,6	0,380±0,2	0,9803
45 °C	35,520±3,0	0,270±0,2	0,9841
	W obecności GSH w pH 7,4		
	k	n	R
	W obecności GSH w pH 7,4		
37 °C	3,738±0,3	0,408±0,2	0,9921
45 °C	4,891±0,4	0,523±0,2	0,9905
	W obecności GSH w pH 7,4		
	k	n	R
	W obecności GSH w pH 7,4		
37 °C	14,391±1,4	0,423±0,3	0,9826
45 °C	26,421±2,8	0,341±0,3	0,9863

Tabela 15. Parametry modelu Korsmeyera-Peppas'a dopasowane do danych eksperymentalnych nanożeli PNIPA-AAc-PEG-SS-dsDNA dla temperatur 37 i 45 °C oraz pH 5,5 i 7,4.

Porównanie wartości parametrów n przedstawionych w Tab.15 doprowadziło do wniosku, że bez obecności GSH, dla obu wartości pH, w 37 °C kinetyka uwalniania Dox następowała zgodnie z mechanizmem dyfuzji Ficka. Natomiast w temperaturze 45 °C występował transport anomalny. W obecności GSH wartość n spadła poniżej 0,43, co

odpowiada "zmniejszonej dyfuzji Ficka". Zmniejszenie wartości współczynnika n związane było ze wzrostem polidispersyjności nanożeli, który towarzyszy procesowi degradacji/dezintegracji lub relaksacji. Podobne efekty zauważyłam w przypadku nanożeli, w których trzysegmentowa hybryda DNA pełniła rolę środka sieciującego.



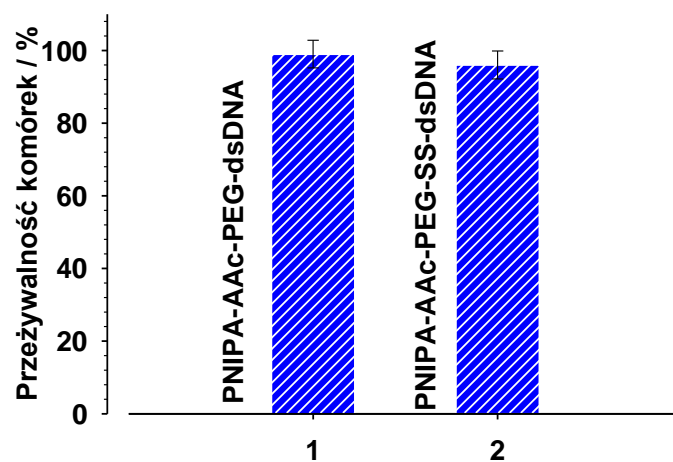
Rys.83. Pulsacyjne uwalnianie Dox z nanożeli PNIPA-AAc-PEG-SS-dsDNA w pH 5,5 oraz w obecności 10 mM GSH. Temperatura ulegała zmianom w zakresie między 37 a 45 °C.

W oparciu o omówione wcześniej badania można stwierdzić, że ułożenie przestrzenne DNA w postaci otoczki na powierzchni nanocząstek ma znaczący wpływ na akumulację interkalatorów jak i na procesy uwalniania leku. Szczególnie w warunkach obecności GSH w lekko kwaśnym środowisku (pH= 5,5) i powyżej temperatury LCST uwalnia się duża ilość leku, co spowodowane jest zmianami konformacyjnymi w DNA i zerwaniem wiązań dwusiarczkowych. Na dodatek zmiany te są w interesującym nas zakresie parametrów odwracalne, co daje możliwość pulsacyjnego uwalniania leku. Na rysunku 83 przedstawiono rezultaty pulsacyjnego uwalniania leku przy przełączaniu temperatury pomiędzy 37 a 45 °C w pH 5,5 oraz w obecności GSH. Można zauważyć, że po podwyższeniu temperatury do 45 °C następuje znaczny skokowy wzrost uwalniania leku. Natomiast po powrocie do 37 °C uwalnianie przebiega znacznie wolniej. Można wnioskować, że gdy temperatura była niższa, zmiany konformacyjne w strukturze DNA były znikome, następowało powolne rozrywanie mostków disiarczkowych, a DNA mogło być chronione przez hydrofobowy rdzeń nanożeli.

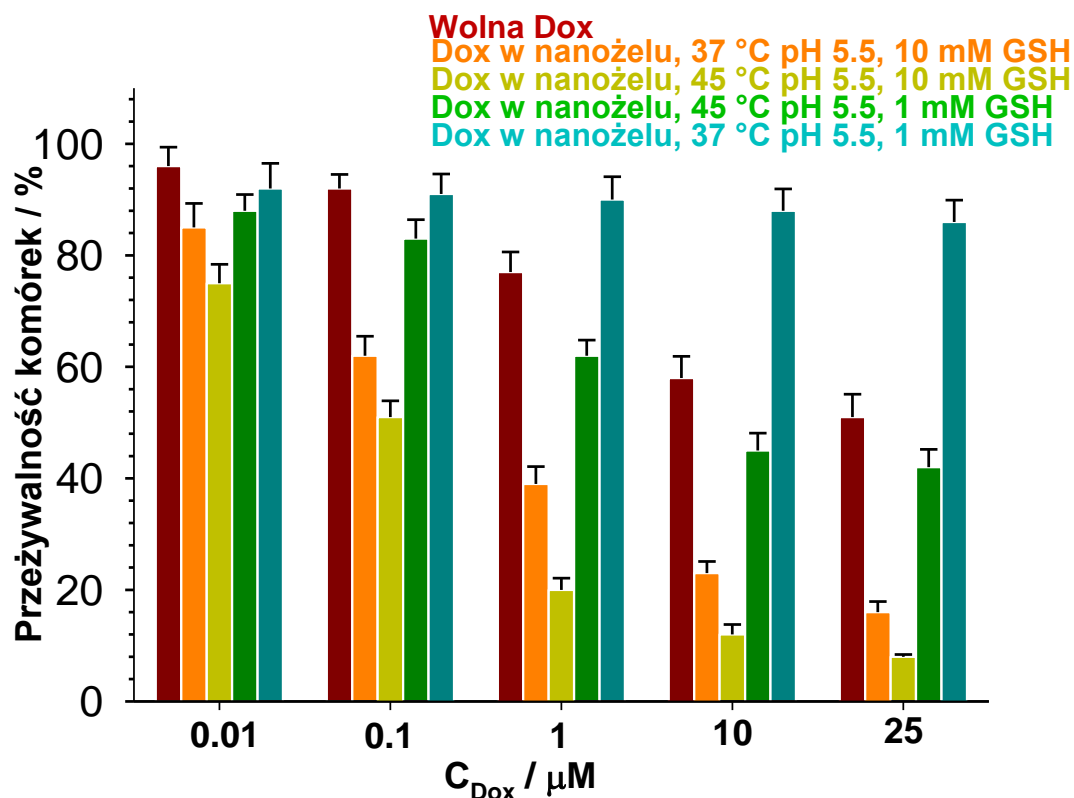
Uwalnianie w tym wypadku było kontrolowane głównie przez procesy dyfuzyjne. Jednak po podwyższeniu temperatury następowały zmiany w konformacji DNA zapewniające większą ekspozycję wiązań -SS-, co przyczyniało się do rozpadu nici DNA pod wpływem glutationu i do dezintegracji zewnętrznej struktury nanożeli. Tego typu uwalnianie leku pozwalało na kontrolowany dodatkowy wyrzut leku w warunkach hipertermicznych, co może być skuteczne w terapii przeciwnowotworowej i uwalnianiu leku bezpośrednio w miejscu chorobowo zmienionym.

9.3.7. Cytotoksyczność

Cytotoksyczność badanych nanożeli PNIPA-AAc-PEG-SS-dsDNA zbadano za pomocą testu MTT po 96 godzinnej ekspozycji na komórki linii Insulinoma β -TC3. Pomiary przeprowadzono zarówno dla nanożeli nieobciążonych doksorubicyną jak i z zakumulowanym lekiem. Na rysunku 84 przedstawiono wyniki testu MTT dla nanożeli PNIPA-AAc-PEG-dsDNA- i PNIPA-AAc-PEG-SS-dsDNA bez obecności leku w ich strukturze. Badania te wykazały, że nanożele bez leku nie zwiększały znacznie proliferacji komórek, w związku z tym nośniki te można było uznać za biokompatybilne. Kolejnym badaniem było badanie skuteczności niszczenia komórek nowotworowych przez nośniki załadowane lekiem. Na rysunku 85 porównano niszczenie komórek nowotworowych przez czystą, wolną doksorubicynę oraz doksorubicynę w nanożelowym nośniku w obecności różnych stężeń GSH. Żywotność komórek linii Insulinoma β -TC3 zmniejszyła się znacznie w porównaniu do roztworu wolnej Dox. W warunkach hipertermicznych żywotność komórek traktowanych Dox uwalnianym z nośników była nawet o 20% większa niż w przypadku czystego roztworu leku.



Rys. 84. Test żywotności (Test MTT) komórek Insulinoma zmierzony po ich 72 godzinnej ekspozycji na nanożele PNIPA-AAc-PEG dsDNA i PNIPA-AAc-PEG-SS-dsDNA; $C_{\text{nanożeli}} = 7,8 \text{ mg ml}^{-1}$, 37°C , $\text{pH } 7,4$.



Rys. 85. Test żywotności komórek MTT linii Insulinoma hodowanych z: wolnym Dox, czystymi nanożelami PNIPA-AAc-PEG-SS dsDNA, Dox zakumulowanym w nanożelach PNIPA-AAc-PEG-SS dsDNA ($C_{nanożeli} = 7,8 \text{ mg mL}^{-1}$, pomiar po 96 godzinach, pH 5,5, 37 °C lub 45 °C w obecności 1mM GSH i 10 mM GSH).

9.3.8. Podsumowanie

Wprowadzenie oligonukleotydów zawierających grupy disiarczkowe -SS- do nanohydrożeli pozwoliło na konstrukcję układów reagujących na większą ilość bodźców środowiskowych. Przyczyniło się to do zwiększenia pojemności nanożeli dla cząsteczek leku i przedłużonego w czasie kontrolowanego uwalniania tego leku. Przeprowadzone badania spektroskopowe i elektrochemiczne oraz użycie metody dynamicznego rozpraszania światła potwierdziły możliwość dynamicznej reorganizacji struktury DNA w syntezowanym nanożelu. Okazało się, że podwójne nici DNA tworzą powłokę zewnętrzną – otoczkę wokół nanożelu.

Wykazano, że procesy zachodzące w nanożelach są pomocne w skutecznym i kontrolowanym uwalnianiu leku oraz prowadzą do częściowej dezintegracji nanożelu. Uwalnianie leku było następstwem dwóch procesów: a) zmian konformacyjnych i rozluźniania podwójnej nici DNA oraz struktury polimerowej nanożelu b) redukcji grup disiarczkowych obecnych w oligonukleotydach a przez to denaturacji helisy DNA. Współdziałanie tych dwóch procesów skutkowało zwiększoną wydajnością podczas pulsacyjnego uwalniania leku i selektywnym uwalnianiem leku w obszarze komórek nowotworowych. Dodatkowo obecność

osłonki olikonukleotydowej może eliminować ryzyko przedwczesnego uwalniania leku, co zmniejsza uboczne skutki terapii przeciwnowotworowej.

Przeprowadzone badania cytotoksyczności zsyntezowanych nośników wykazały, że niewypełnione lekiem nanożele nie wykazują znacznej cytotoksyczności. Natomiast nanożele z zakumulowanym lekiem wykazywały zdolność niszczenia komórek nowotworowych linii Insulinoma większą o 20% niż czysty roztwór doksorubicyny. Związane było to z minimalizacją negatywnego efektu wiązania się doksorubicyny z białkami osocza i białkami mikroskomalnymi.

10. Końcowe wnioski

Przeprowadzone w niniejszej rozprawie doktorskiej badania doprowadziły do otrzymania nowych nośników leków przeciwnowotworowych na bazie hydrożeli modyfikowanych oligonukleotydami w skali makro oraz nano. Opracowano skuteczne metody syntezy, oraz zbadano właściwości fizykochemiczne jak i również użyteczność biologiczną otrzymanych nanohydrożeli. Otrzymane wyniki pozwalają zaproponować nowe sposoby podawania leków w istniejących już terapiach przeciwnowotworowych.

Odnosnie pierwszego mojego zadania badawczego, którym było unieruchomienie fizyczne natywnego DNA w matrycy polimerowej bez konieczności tworzenia wiązań kowalencyjnych: przeprowadzone badania wykazały, że możliwa jest tego typu immobilizacja DNA w sieci polimerowej z 80% wydajnością w przypadku podwójnych nici DNA, a 60% w przypadku pojedynczych nici. Udowodniłam również, że możliwe jest bezpośrednie monitorowanie zmian strukturalnych cząsteczek DNA obecnych w sieci hydrożelu za pomocą metod elektrochemicznych. Wykazałam też, że za pomocą metod elektrochemicznych możliwe jest bezpośrednie monitorowanie w DNA lokalnych zmian przeddenaturacyjnych związanych z rozplątywaniem nici i zmianą konformacji. Zmiany te nie były dobrze widoczne na krzywych spektroskopowych. Ostatecznie pomiary elektrochemiczne w celu kontroli procesu denaturacji nici DNA okazały się bardzo użyteczne. Z aplikacyjnego punktu widzenia udowodniłam, że hydrozele PAM/DNA umożliwiają skuteczną akumulację doksorubicyny poprzez interkalację leku do podwójnej helisy DNA. Uwolnienie leku z matrycy pod wpływem temperatury zachodziło na drodze denaturacji podwójnej nici DNA i miało również miejsce w temperaturach stosunkowo niższych od temperatury topnienia oligonukleotydów. Przydatny okazał się system oscylowania temperatury między 37 a 45 °C; w tych warunkach uzyskano podwyższoną wydajność uwalniania leku z matryc hydrożelowych.

Etap pierwszy badań był dobrą podstawą do próby zminiaturyzacji układów hydrożelowych. Udało się zsyntezować nanożele zmodyfikowane odpowiednio wyselekcjonowanymi odcinkami DNA. Była to typowa modyfikacja typu chemicznego. Proces włączenia oligonukleotydów do sieci polimerowej był skuteczny dzięki wcześniejszej modyfikacji nici DNA grupami akrylowymi.

Od strony funkcjonalnej, podwójne nici DNA były tworzone w różny sposób. Pierwszy skuteczny sposób to modyfikacja nanożeli trzysegmentową hybrydą DNA, gdzie dwie nici były bezpośrednio włączone do sieci nanożelu, natomiast trzecia nić była komplementarna w połowie do obydwu nici. Nić komplementarna została dołączona tuż po syntezie nanożelu. Udowodniłam, że parametry fizykochemiczne uzyskanych nanosystemów, takie jak: rozmiar, potencjał zeta oraz aspekty struktury wewnętrznej sprzyjały penetracji przez nanożele tkanek nowotworowych. Okazało się, że zsyntezowane nanożele PNIPA-AAc-oligo123 posiadały wyższą zdolność akumulacji leku przeciwnowotworowego - dokсорubicyny w stosunku do nanożeli niezmodyfikowanych ze względu na możliwość interkalacji leku pomiędzy pary zasad dsDNA. Fakt ten pozwolił na stworzenie nośnika leku o przedłużonym czasie uwalniania, co może skutkować lepszym efektem terapeutycznym. Stwierdziłam, że uwalnianie leku zachodziło w podwyższonej temperaturze, takiej, która stosowana jest rutynowo w terapii hipertermicznej, a mechanizm uwalniania był wynikiem dwóch odwracalnych procesów: zmiany konformacji dwuniciowej trzysegmentowej struktury DNA oraz kurczenia się sieci hydrożelu. Badania wykazały dobrą biokompatybilność matryc oraz wysoką cytotoksyczność Dox w nośnikach w stosunku do linii komórek nowotworowych Hella i Insulinoma.

Drugi etap badań zakładał syntezę degradowalnego nośnika poprzez użycie oligonukleotydów jako jedynej formy środka sieciującego nanożel. Udowodniono, że możliwa jest synteza nanożelu sieciowanego za pomocą trzysegmentowej hybrydy DNA bez użycia dodatkowych środków sieciujących. Wykazano możliwość całkowitej, nieodwracalnej degradacji sieci nanohydrożelu pod wpływem wysokiej temperatury (70 °C). Jednak okazało się, że w nieco niższej temperaturze (45 °C) degradacja nanożeli może mieć charakter odwracalny ze względu na proces renaturacji DNA. Takie właściwości mogą być przydatne przy uwalnianiu leków w zmiennych warunkach temperaturowych. Dzięki zastosowaniu wewnętrznego sieciowania nanożelu za pomocą DNA, uzyskałam znacznie wyższe wartości wydajności akumulacji leku. Z kolei wykazałam, że uwalnianie leku zachodziło według dwóch mechanizmów zależnych od temperatury: pierwszy związany był z lokalnymi zmianami konformacyjnymi i kurczeniem się sieci nanożelu, natomiast drugi z bezpośrednią degradacją sieci polimerowej wskutek denaturacji DNA. Otrzymane wyniki sugerują, że zsyntezowany

nośnik chroni aktywną formę leku i pozwala na uwolnienie się jej dopiero pod wpływem specyficznych warunków środowiskowych. Spodziewam się również, że degradacja nośnika powinna ułatwić jego późniejszą eliminację z ustroju. Testy cytotoksyczności wykonane przy współpracy z Wyższą Szkołą Rehabilitacji w Warszawie na liniach komórkowych Insulinoma dla nośników z zakumulowaną doksorubicyną wykazały wysoką proliferację komórek nowotworowych.

W ostatnim etapie moich badań do sieci nanożelu zostały wprowadzone oligonukleotydy zawierające grupy disiarczkowe -SS-. Wyniki wskazują, że uzyskane nanożele były wrażliwe na trzy rodzaje bodźców zewnętrznych: temperaturę, pH i obecność glutationu. Przeprowadzone badania DLS, spektroskopowe oraz elektrochemiczne potwierdziły dynamiczną reorganizację struktury DNA na powierzchni nanożelu. Okazało się, że podwójne nici DNA tworzą powłokę - otoczkę zewnętrzną nanożelu. Uwalnianie leku było następstwem dwóch procesów: a) zmian konformacyjnych DNA, czyli rozluźniania podwójnej struktury sieci DNA oraz struktury polimerowej nanożelu oraz b) redukcji grup disiarczkowych obecnych w oligonukleotydach. Współdziałanie tych efektów skutkowało zwiększoną wydajnością podczas pulsacyjnego uwalniania leku sterowanego przełączaniem temperatury pomiędzy 37 a 45 °C. Przeprowadzone badania cytotoksyczności wykazały, że zsyntezowane nanożele nie wykazują znacznej cytotoksyczności. Natomiast nanożele z zakumulowanym lekiem wykazywały wysoką zdolność niszczenia komórek nowotworowych.

11. Streszczenie w języku polskim

W niniejszej pracy doktorskiej podjęłam się zadania stworzenia systemów uwalniania leków opartych na hydrożelach zmodyfikowanych materiałem genetycznym w różnych formach. Bezpośrednim celem pracy była dokładana analiza fizykochemiczna zsyntezowanych nośników oraz zbadanie akumulacji i uwalniania wybranego leku przeciwnowotworowego. W swojej pracy zsyntezowałam makrożele oraz nanożele. Ze względu na korzystniejsze cechy nośników w skali nano, większa część mojej pracy skupia się właśnie na nanohydrożelach. W badaniach wykorzystano zjawisko objętościowego przejścia fazowego i jego zmianę pod wpływem dodatku oligonukleotydów. Istotne było uwalnianie leku w warunkach fizjologicznych. Badane były również zmiany zachodzące w niciach DNA przyłączonych do matrycy polimerowej pod wpływem zmiennych warunków środowiskowych. Zsyntezowałam nanożele o przedłużonym uwalnianiu substancji, nanożele degradowalne pod wpływem temperatury oraz nanożele multiresponywne, czułe na glutation. Praca zawiera dokładną

doświadczalną i teoretyczną analizę procesu uwalniania leku z otrzymanych matryc polimerowych.

Rozprawa rozpoczyna się wstępem oraz celem badań, następnie występuje część literaturowa. W rozdziale drugim zawarłam wprowadzenie w tematykę nośników leków oraz przedstawiłam pokrótce różne rodzaje nośników leków opisane w literaturze. W rozdziale trzecim przybliżyłam definicję oraz charakterystykę objętościowego przejścia fazowego hydrożeli polimerowych ze szczególnym uwzględnieniem hydrożeli czułych na bodźce zewnętrzne. Przetworzyłam również dokładną analizę hydrożeli czułych na temperaturę, pH oraz substancje biologicznie aktywne takie jak: glukoza, enzymy czy glutation. Na koniec skupiłam się na opisanu dotychczasowych prac przedstawiających modyfikację hydrożeli molekułą DNA.

W rozdziale czwartym przybliżyłam dokładnie tematykę hydrożeli w skali nano oraz przedstawiłam ich zalety w stosunku do ich makro odpowiedników. W tej części pracy skupiłam się również na teoretycznym opisie najczęściej stosowanych metod syntezy oraz modyfikacji nanożeli materiałem biologicznym.

W rozdziale piątym opisałam rolę DNA w systemach kontrolowanego uwalniania leków. Została tutaj dokładnie opisana budowa cząsteczki kwasu nukleinowego, czynniki wpływające na zmiany jego struktury oraz oddziaływania z lekami antracyklinowymi. Opisałam również różne metody detekcji DNA ze szczególnym naciskiem na omówienie metod elektrochemicznych.

Część eksperymentalna składa się z pięciu rozdziałów. Na początku znajduje się szczegółowy opis oraz charakterystyka wykorzystanych w pracy odczynników i aparatury. Następnie opisałam dość szczegółowo techniki badawcze stosowane przeze mnie w pracy doświadczalnej.

W rozdziale ósmym opisałam początkowe etapy mojej pracy badawczej związanej z modyfikacją hydrożeli biomolekułą DNA w skali makro. Przedstawiłam tutaj dokładnie proces syntezy oraz oczyszczania hydrożeli z niekowalencyjnie związanym natywnym DNA. Zbadana została wydajność wprowadzania podwójnych oraz pojedynczych nici DNA do sieci oraz morfologia powstałych matryc. Ważnym etapem w tej części pracy była dokładna analiza zmian zachodzących w DNA wprowadzonego do hydrożelu za pomocą metod elektrochemicznych. Udowodniono, że techniki elektrochemiczne pozwalają na bezpośrednie monitorowanie lokalnych zmian strukturalnych w DNA związanych z rozluźnianiem nici i zmianą konformacji. Ważnym krokiem było monitorowanie zmian utleniania zasad azotowych w DNA obecnych w hydrożelu w zależności od temperatury. Końcowym efektem

pracy była analiza akumulacji i uwalniania leku pod wpływem bodźca temperaturowego. Podstawową ideą tego typu nośników było wykorzystanie nici DNA obecnej w hydrożelu jako rezerwuaru leku zakumulowanego na drodze interkalacji. Wyniki uzyskane w tej części pracy stały się podstawą do utworzenia bardziej złożonych układów i zminiaturyzowania nośników tworząc nanożele polimerowe.

Rozdział dziewiąty jest obszerny, ponieważ zawiera większość moich wyników eksperymentalnych. W tym rozdziale skupiłam się na syntezie nanożeli na bazie monomeru NIPA oraz kwasu akrylowego. Nanożele były zmodyfikowane różnymi formami DNA. Materiał genetyczny w tym przypadku był włączany do sieci za pomocą wiązań kowalencyjnych pomiędzy ugrupowaniami obecnymi w nanożelu a odpowiednio zmodyfikowanymi (grupy akrylowe, ugrupowanie PEG2000) odcinkami DNA. Rozdział ten składa się z trzech podrozdziałów opisujących trzy niezależne rodzaje nanożeli zmodyfikowane oligonukleotydami w różny sposób.

Pierwszy podrozdział dotyczy nanożeli sieciowanych standardowym środkiem sieciującym BIS i modyfikowanych hybrydą DNA składającą się z dwóch odcinków przyłączonych do sieci i trzeciego komplementarnego w połowie do dwóch obecnych już w sieci. Synteza była prowadzona dwuetapowo. Przed wyborem konkretnych sekwencji nici DNA zostały przeprowadzone symulacje, które określiły prawdopodobieństwo hybrydyzacji. Ważnym etapem w tym rozdziale była dokładna analiza parametrów fizykochemicznych nanożeli oraz zbadanie ich morfologii. Przeprowadzona została również dokładna analiza wydajności wprowadzenia DNA oraz jego hybrydyzacji; wykorzystano tu metody spektroskopowe oraz elektrochemiczne. Najważniejszym etapem badań, pod kątem aplikacyjnego zastosowania tego typu nanożeli, była analiza akumulacji i uwalniania leku przeciwnowotworowego. Wykazano, że tego typu układy charakteryzują się przedłużonym w czasie uwalnianiem substancji leczniczej. Badania komórkowe wykazały natomiast dobrą biokompatybilność nośników oraz wysoką skuteczność niszczenia komórek nowotworowych linii Hella i Insulinoma.

W podrozdziale drugim skupiłam się na syntezie nanożelu, który byłby degradowany pod wpływem wysokiej temperatury. Zsyntezowałam nanożele usieciowane jedynie trzysegmentową hybrydą DNA. Do syntezy zostały użyte te same sekwencje oligonukleotydów, co w poprzednim projekcie, jednak cały proces syntezy był jednoetapowy. W tej sekcji została przedstawiona dokładnie synteza, morfologia oraz dokładna analiza parametrów fizykochemicznych uzyskanych nanożeli. Został również przeanalizowany proces temperaturowej degradacji sieci spowodowany denaturacją trzysegmentowej hybrydy

wbudowanej w sieć hydrożelu. Wykazano dwie drogi uwalniania leku w temperaturze 45 °C oraz 70 °C. Dodatkowo udowodniono, że zmiana środowiska reakcji na lekko kwaśne (charakterystyczne dla tkanek nowotworowych) ma również wpływ na ilość uwalnianego leku. Przeprowadzone badania komórkowe wykazały, że zarówno nanożele jak i produkty ich temperaturowej degradacji były bezpieczne dla komórek organizmu. Natomiast testy cytotoksyczności naładowanych doksorubicyną nośników wykazały wysoką skuteczność niszczenia komórek nowotworowych linii Insulinoma.

Ostatni podrozdział przedstawiał nieco inną koncepcję. Skupiłam się tutaj na syntezie nanożeli czułych na kilka rodzajów bodźców jednocześnie. Zostały zsyntezowane nanożele modyfikowane kowalencyjnie odcinkami DNA zawierającymi w swojej strukturze mostki disiarczkowe. Zastosowanie tego typu oligonukleotydów uwrażliwiało dodatkowo cząstki nanożelu na obecność silnych środków redukujących takich jak glutation. Pod wpływem glutationu następowało rozszczepienie nici DNA z jednoczesnym uwolnieniem leku. Przeprowadzone w tej części badania potwierdziły dynamiczną reorganizację struktury DNA w syntezyowanym nanożelu oraz utworzenie otoczki oligonukleotydowej na rdzeniu polimerowym. Wykazano, że procesy zachodzące w nanożelach są pomocne w skutecznym i kontrolowanym uwalnianiu leku oraz częściowej dezintegracji nanożelu. Współdziałanie zmian konformacyjnych rozluźniających strukturę DNA pod wpływem temperatury oraz redukcji grup disiarczkowych skutkowało zwiększoną wydajnością podczas pulsacyjnego uwalniania leku i zwiększonym uwalnianiem leku w komórkach nowotworowych. Przeprowadzone badania komórkowe dają nadzieję, że dzięki obecności nanohydrożelowego nośnika zminimalizowane zostaną negatywne efekty wiązania doksorubicyny przez białka osocza. Niewątpliwie zwiększyła się skuteczność niszczenia komórek nowotworowych linii Insulinoma.

W rozdziale dziesiątym zostały przedstawione końcowe wnioski pracy doktorskiej i potwierdzenie skuteczności zsyntezowanych nośników pod kątem zaawansowanych terapii przeciwnowotworowych.

W pracy przedstawiony został również spis publikacji powstałych podczas realizacji mojej pracy doktorskiej. Natomiast w końcowym rozdziale przedstawiłam literaturę, z której korzystałam podczas pisania niniejszej rozprawy.

12. Streszczenie w języku angielskim

In my doctoral thesis, I undertook the task of creating drug release systems based on hydrogels modified with various forms of genetic material. The main goal of these investigations was the thorough physicochemical analysis of the synthesized materials and the study of the accumulation and release of the anticancer drug. In my work, I synthesized macrogels and nanogels. Due to the more favorable features of nanoscale carriers, most of my work was focused on this issue. The research was directed mainly to the analysis of the phenomenon of the gel volume-phase-transition and its changes caused by addition of oligonucleotides. The context was the drug release under physiological conditions. I also studied where the changes occurred in the DNA attached to the polymer matrix under the changing environmental conditions. The incorporation of various types of oligonucleotides into the polymer network resulted in a change in the properties of the nanoparticles. I synthesized nanogels that were characterized by prolonged release of substances, nanogels that were degradable under the influence of temperature, and multi-responsive nanogels sensitive to glutathione. The work presents an accurate experimental and theoretical analysis of the drug release process from the polymer matrices.

The dissertation begins with the introduction and the aim of the research. Then there is a literature section. In the second chapter, I placed an introduction to the subject of the drug carriers and presented briefly various types of drug carriers described in the literature. In the third chapter the definition, characteristics, and analysis of the volume phase transition of the polymer hydrogels is given. A particular emphasis is put on the sensitive hydrogels. I provided a precise analysis of temperature-sensitive hydrogels, pH-sensitive hydrogels, and biologically-active-substances sensitive hydrogels; such substances as glucose, enzymes and glutathione. In the end, I focused on the previous works dealing with the modification of hydrogels with DNA molecules.

In the fourth chapter, I took up the topic of nanoscale hydrogels and presented their advantages in relation to the macroscale equivalents. In this part of the work, I focused on the description of the most commonly used methods of synthesis and modification of nanogels with biological material.

In the fifth chapter, I described the role of DNA in controlled-drug-release systems. The structure of the nucleic acid molecule, factors influencing the changes in its structure and interactions with anthracycline drugs were described in detail. I also described various methods of DNA detection with particular emphasis on the electrochemical methods.

The experimental section consists of five chapters. At the beginning, there is a detailed description and characteristics of the reagents and equipment used in the work. Then, I described in detail the research techniques used by me in the experimental work.

In the eighth chapter, I presented the initial stages of my research work related to the modification of hydrogels on the macro scale with a DNA biomolecule. I presented there the process of synthesis and purification of the hydrogels with non-covalently bound native DNA. The efficiency of introducing double- and single strands of DNA on the network as well as the morphology of the resulting matrices was examined. An important step in this part of the work was a thorough analysis of the changes taking place in the DNA molecules introduced into the hydrogel by using the electrochemical methods. It was proved that the electrochemical techniques allowed direct monitoring of local structural changes in DNA associated with the loosening- and the change of conformation of the thread. An important step was to monitor the oxidation of nitrogen bases in the DNA present in the hydrogel in function of temperature. The final result of the investigation was the analysis of drug accumulation and drug release under the influence of temperature stimulus. The basic idea of this type of drug carriers was the use of the DNA strand present in the hydrogel as a reservoir of drug that was accumulated through intercalation. The results obtained in this part of PhD thesis became the basis for the creation of more complex systems and the miniaturization of the carriers.

Chapter ninth is quite extensive and constitutes the majority of my experimental results. In this chapter, I focused on the synthesis of nanogels based on NIPA and acrylic acid monomer and modified with various forms of DNA. The genetic material, in this case, was incorporated into the network by means of covalent bonds between the groups present in the nanogel and the correspondingly modified (by acrylic groups or by PEG2000 groups) DNA sections. This chapter consists of three subchapters describing three independent types of oligonucleotide-modified nanogels.

The first section of the chapter describes the nanogels crosslinked with the standard BIS crosslinker and modified with a DNA hybrid. The hybrid consisted of two strands connected to the network, while the third strand was complementary in half to those two already present in the network. The synthesis was carried out in two steps. Before selecting particular DNA sequences for the modification, the simulations, which determined the probability of the hybridization process, were carried out. An important point in this chapter was a thorough analysis of the physicochemical parameters of the nanogels and the study of their morphology. A thorough analysis of the efficiency of DNA incorporation and hybridization using spectroscopic and electrochemical methods was also carried out. The most important stage of

this research was the analysis of the accumulation and the release of the anticancer drug. It was found, that those systems were characterized by a sustained release of the drug substance. Additionally, the cellular tests demonstrated good biocompatibility of the nanocarriers and high efficiency of destruction of the tumor cells of the Hella and Insulinoma lines.

In the second section of this chapter, I focused on the synthesis of nanogels that would be degraded under the influence of high temperature. I synthesized nanogels cross-linked only with a three-segment hybrid of DNA. The same oligonucleotide sequences for the synthesis as in the previous project were used, but the whole synthesis process was one-step. The exact synthesis steps, morphology and accurate analysis of the physical-chemical parameters of the obtained nanogels were presented. The process of thermal degradation of the network due to the denaturation of the three-segment hybrid embedded in the hydrogel network as well as the reversible changes in DNA associated with the conformational changes were also analyzed. Two ways of drug release took place at 45 and 70 °C. In addition, it was demonstrated that a slight change in the acidity of the environment also affected the amount of drug released. The conducted cell research showed that both nanogels and their degradation products were safe for the body cells. Contrary, the cytotoxicity tests of doxorubicin-loaded carriers demonstrated a high destruction of the cancer cells from the Insulinoma cell line.

The last section in the eight chapter presents a slightly different concept. I focused on the synthesis of nanogels sensitive to several types of stimuli at the same time. The nanogels covalently modified by DNA sections that contained the disulfide bridges were synthesized. The use of this type of oligonucleotides additionally sensitized the nanogel particles to the presence of such reducing agents as glutathione. In the presence of glutathione the DNA strands were cleaved with the simultaneous release of the drug. The research conducted in this part of the work confirmed the dynamic reorganization of the DNA structure in the synthesized nanogel and the formation of an oligonucleotide shell on the polymer core. It has been shown that the processes occurring in the nanogels were helpful in the effective and controlled release of the drug and in partial disintegration of the nanogels. The cooperation of the conformational changes that lead to loosening of the DNA structure upon increase of temperature and the reduction of the disulfide groups resulted in an increased efficiency of drug release during the pulsatile nanogel treatment. The cellular studies might indicate that due to the presence of the nanohydrogel carrier the negative effects of the doxorubicin binding by the plasma proteins could be minimized and that resulted in a high effectiveness of the destruction of the cancer cells of the Insulinoma line.

The tenth chapter presents the final conclusions of the doctoral thesis and underlines the potential effectiveness of the synthesized carriers for the advanced anticancer therapies.

A list of papers published during the implementation of my doctoral work is presented in the theses. And finally, in the final chapter, I presented the literature I used at the time of writing this dissertation.

13. Spis publikacji powstałych podczas realizacji doktoratu

Podczas mojej pracy doktorskiej powstały następujące publikacje:

1. E. Zabost, **W. Chmielowiec**, T. Rapecki, M. Karbarz, Z. Stojek, *Strongly enhanced guanine electrooxidation caused by temperature induced volume-phase-and conformational transitions in DNA/PNIPAA composites*, *Electrochemistry Communication*, 42 (2014) 50-54.
2. P. Nakielski, S. Pawłowska, F. Pierini, **W. Liwińska**, P. Hejduk, K. Zembrzycki, E. Zabost, T.A. Kowalewski, *Hydrogel nanofilaments via core-shell electrospinning*, *PLOS one* DOI:10.1371/journal.pone.0129816.
3. **W. Liwińska**, E. Zabost, M. Karbarz, E. Kurek, M. Lyp, M. Donten, Z. Stojek, *Electrochemical examination of ability of dsDNA/PAA composites for storing and releasing of doxorubicin*, *Bioelectrochemistry*, 109 (2016) 1–8.
4. **W. Liwińska**, M. Symonowicz, I. Stanisławska, M. Lyp Z. Stojek, E. Zabost, *Environmentally sensitive nanohydrogels decorated with tri-segment oligonucleotide helix for controlled loading and prolonged release of intercalators*, *RSC Advances*, 6 (2016) 91045-91059.
5. E. Zabost, **W. Liwińska**, A. Kowalczyk, A. Głowińska, A. Tomczyszyn, A. Misicka, Z. Stojek, *Complexes of DNA with peptide derivatives of cisPt*, *Electroanalytical examination*, *Electrochimica Acta*, 219 (2016) 568-576.
6. **W. Liwińska**, I. Stanisławska, M. Lyp, M. Maćkiewicz. Z. Stojek, E. Zabost, *A degradable nanogel drug carrier crosslinked with three-oligonucleotide hybrids for two-way drug release in mild and high hyperthermia treatment*, *J. Mat. Chem. B*, 5 (2017) 4713-4724.
7. **W. Liwińska**, I. Stanisławska, M. Lyp, Z. Stojek, E. Zabost, *Switchable conformational changes of DNA nanogel shells containing disulfide–DNA hybrids for controlled drug release and efficient anticancer action*, *RSC Advances*, 9 (2019) 3736–13748.
8. I. Stanisławska, **W. Liwińska**, M. Lyp, Z., E. Zabost, *Recent Advances in Degradable Hybrids of Biomolecules and NGs for Targeted Delivery*, *Molecules* 24 (2019) 1873.

14. Literatura

- [1] Svenson S., *Carrier-Based Drug Delivery*, American Chemical Society, Washington, 2004.
- [2] Bernkop-Schnürch A. *Nanocarrier systems for oral drug delivery: do we really need them?*, Eur. J Pharm Sci., 49 (2013) 272–277.
- [3] Wang J., Lu Z., Wientjes M.G., Au J.L., *Delivery of siRNA Therapeutics: Barriers and Carriers*, AAPS J., 12 (2010) 492–503.
- [4] Douroumis D., *Drug Delivery Strategies for Poorly Water-Soluble Drugs*, Wiley UK 2012.
- [5] Sanjay S., Dou M., Fu G., Xu F., Li X., *Controlled Drug Delivery Using Microdevices*, Curr. Pharm. Biotechnol., 17 (2016) 772–787.
- [6] Santini J.T., Richards A.C., Scheidt R., Cima M.J., Langer R., *Microchips as Controlled Drug Delivery Devices*, Angew. Chem., 39 (2000) 2396–2047.
- [7] Matthews D.R., Lang D.A., Burnett M.A., Turner R.C., *Control of pulsatile insulin secretion in man*, Diabetologia 24 (1983) 231–237.
- [8] Muzykantov, V.R. *Drug delivery by red blood cells: vascular carriers designed by mother nature*, Expert Opin. Drug Deliv. 7 (2010) 403–427.
- [9] Strebhardt K., Ullrich A. *Paul Ehrlich's magic bullet concept: 100 years of progres*, Nat. Rev. Cancer, 8 (2008) 473–480.
- [10] Mishra M., Pant P., Porwal A., Jaiswal J., Aquib Samad M., Tiwari S., *Targeted Drug Delivery: A Review*, Am. J. Pharm. Tech Res., 6 (2016) 1–24.
- [11] Maeda H., Bharate G.Y., Daruwalla J., *Polymeric drugs for efficient tumor targeted drug delivery based on EPR-effect*, Eur. J. Pharm. Biopharm., 71 (2009) 409–419
- [12] Torchilin V.P., *Drug targeting*, Eur. J. Pharm. Sci., 11 (2000) 81–91.
- [13] Iyer A.K., Khaled G., Fang J., Maeda H., *Exploiting the enhanced permeability and retention effect for tumor targeting*, Drug Discov. Today, 11 (2006) 812–818.
- [14] Haley B., Frenkel E., *Nanoparticles for drug delivery in cancer treatment*, Urol. Oncol., 26 (2008) 57–64.
- [15] Allen T.M., *Ligand-targeted therapeutics in anticancer therapy*, Nat. Rev. Cancer, 2 (2002) 750–763.
- [16] Alexis F., Pridgen E.M., Langer R., Farokhzad O.C., *Nanoparticle technologies for cancer therapy*, Handb. Exp. Pharmacol. 197 (2010) 55–86.
- [17] Lammers T., Kiessling F., Hennink W.E., Storm G., *Drug targeting to tumors: principles, pitfalls and (pre-) clinical progres*, J. Controlled Release, 161 (2012) 175–187.
- [18] Peer D., Karp J.M., Hong S., Farokhzad O.C., Margalit R., Langer R., *Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy*, Nat. Nanotechnol., 2 (2007) 751–760.
- [19] Danhier F., Feron O., Préat V., *To exploit the tumor microenvironment: Passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery*, J. Controlled Release, 148 (2010) 135–146.
- [20] Cheng J.P., Gu Y.J., Cheng S.H., Wong W.T., *Surface functionalized gold nanoparticles for drug delivery*, J. Biomed. Nanotechnol., 9 (2013) 1362–1369.
- [21] Galanzha E.I., Shashkov E., Sarimollaoglu M., Beenken K.E., Basnakian A.G., Shirlif M.E., Kim J.W., Smeltzer M.S., Zharov V.P., *In vivo magnetic enrichment, photoacoustic diagnosis, and photothermal purging of infected blood using multifunctional gold and magnetic nanoparticles*, PLoS ONE 7 (2012) e45557.

-
- [22] Chatterjee D.K., Diagaradjane P., Krishnan S., *Nanoparticle-mediated hyperthermia in cancer therapy*, Ther. Deliv., 8 (2011) 1001–1014.
 - [23] Cho W.S.; Cho M.; Jeong J., Choi M.; Han B.S., Shin H.S., Hong J.; Chung B.H.; Jeong J.; Cho M.H., *Size-dependent tissue kinetics of PEG-coated gold nanoparticles*, Toxicol. Appl. Pharmacol., 245 (2010) 116–123.
 - [24] Otsuka H., Nagasaki Y., Kataoka K., *PEGylated nanoparticles for biological and pharmaceutical applications*. Adv. Drug Deliv. Rev., 55 (2003) 403–419.
 - [25] Takae S., Akiyama Y., Otsuka H., Nakamura T., Nagasaki Y., Kataoka K., *Ligand density effect on biorecognition by PEGylated gold nanoparticles: Regulated Interaction of RCA (120) lectin with lactose installed to the distal end of tethered PEG strands on gold surface*. Biomacromol., 6 (2005) 818–824.
 - [26] Wangoo N., Bhasin K.K., Mehta S.K., Suri C.R., *Synthesis and capping of water-dispersed gold nanoparticles by an amino acid: Bioconjugation and binding studies*. J. Colloid Interface Sci., 323 (2008) 247–254.
 - [27] Sun L., Liu D., Wang Z., *Functional gold nanoparticle-peptide complexes as cell targeting agents*, Langmuir, 24 (2008) 10293–10297.
 - [28] Javier D.J., Nitin N., Levy M., Ellington A., Richards-Kortum R., *Aptamer-targeted gold nanoparticles as molecular specific contrast agents for reflectance imaging*. Bioconjugate Chem., 19 (2008) 1309–1312.
 - [29] Chen C., Wang W., Ge J., Zhao X.S., *Kinetics and thermodynamics of DNA hybridization on gold nanoparticles*. Nucl. Acid Res., 37 (2009) 3756–3765.
 - [30] Jamieson T., Bakhshi R., Petrova D., Pocock R., Imani M., Seifalian A.M., *Biological applications of quantum dots*, Biomaterials 28 (2007) 4717–4732.
 - [31] Zhao M.X., Zhu B.J., *The Research and Applications of Quantum Dots as Nano-Carriers for Targeted Drug Delivery and Cancer Therapy*, Nanoscale Res Lett., 11 (2016) 207–216.
 - [32] Valizadeh A., Mikaeili H., Samiei M., Farkhani S.M., Zarghami N., Kouhi M., Akbarzadeh A., Davaran S., *Quantum dots: synthesis, bioapplications and toxicity*, Nanoscale Res. Lett., 7 (2012) 480–495.
 - [33] Chan W.C., Maxwell D.J., Gao X., *Luminescent quantum dots for multiplexed biological detection and imaging*, Curr. Opin. Biotechnol., 13 (2002) 40–46.
 - [34] Tsoi K.M., Dai Q., Alman B.A., Chan W.C., *Are quantum dots toxic? Exploring the discrepancy between cell culture and animal studies*, Acc. Chem. Res., 19 (2013) 662–671.
 - [35] Chen Y, Chen H, Shi J. *Inorganic nanoparticle-based drug codelivery nanosystems to overcome the multidrug resistance of cancer cells*. Mol Pharm., 4 (2014) 2495–510.
 - [36] Tang F.Q., Li L., Chen D., *Mesoporous silica nanoparticles: Synthesis, biocompatibility and drug*, Adv. Mater., 24 (2012) 1504–1534.
 - [37] Vallet-Regi M., Rámila A., del Real R.P., Pérez-Pariente J., *A new property of MCM-41: Drug delivery system*. Mater., 13 (2001) 308–311.
 - [38] Ajayan P.M., *Nanotubes from carbon*, Chem. Rev. 99 (1999) 1787–1800.
 - [39] Liu Z., Zhou X., Qian Y. Chem, *Synthetic methodologies for carbon nanomaterials*, Adv. Mater., 22 (2010) 1963–1966.
 - [40] Liu J.H., Cao L., Luo P.G., Yang S.T, Lu F., Wang H., Meziani M.J., Haque S.A., Liu Y., Lacher S., *Fullerene conjugated doxorubicin in cells*. ACS Appl. Mater. Interfaces 2 (2010) 1384–1398.
 - [41] Yang W., Ratinac K.R., Ringer S.P, Thordarson P., Gooding J.J., Braet F., *Carbon nanomaterials in biosensors: Should you use nanotubes or graphene?*, Angew. Chem., 49 (2010) 2114–2138.

-
- [42] Liu K., Zheng W., Wang C., Chiu YC., Cheng C.L., Lo Y.S, Chen C., Chao J.I., *Covalent linkage of nanodiamond paclitaxel for drug delivery and cancer therapy*. Nanotechnol., 21 (2010) 315106-31537.
 - [43] Stout D. Recent Advancements in *Carbon Nanofiber and Carbon Nanotube Applications in Drug Delivery and Tissue Engineering*, Curr. Pharm Des.21 (2015) 2037-2044.
 - [44] Laurila T., Sainio S., Caroab M. A., *Hybrid carbon based nanomaterials for electrochemical detection of biomolecules*, Prog.in Mat. Science. 88 (2017) 499-594.
 - [45] Liu Z., Zhou X., Qian Y., *Synthetic methodologies for carbon nanomaterials*, Adv. Mater., 22 (2010) 1963-1966.
 - [46] Tripathi A., Saraf S. A., Saraf S. K., *Carbon Nanotropes: A Contemporary Paradigm in Drug Delivery*, Mater. 8 (2015) 3068-3100.
 - [47] Mundra R.V., Wu X., Sauer J., Dordick J.S, Kane R.S., *Nanotubes in biological applications*, Curr. Opin. Biotechnol., 28 (2014) 25–32.
 - [48] Zhao W., Gao Y., Brook M.A., Li Y., *Adsorption of Poly(rA) on the Carbon Nanotube Surface and its Hybridization with Poly(rU)*, Chem. Commun., 34 (2006) 3582-3584.
 - [49] Rastogi V., Yadav P., Bhattacharya S.S., Mishra A.K., Verma N., Verma A., *Carbon Nanotubes: An Emerging Drug Carrier for Targeting Cancer Cells*. J Drug Deliv.2014 (2014) 1–23.
 - [50] Terranova M.L., Sessa V., Rossi M., *The world of carbon nanotubes: an overview of CVD growth methodologies*, Chem. Vap. Deposition, 12 (2006) 315-325.
 - [51] Tripisciano C., Kraemer K., Taylor A., *Single-wall carbon nanotubes based anticancer drug delivery system*. Chem. Phys. Lett., 478 (2009) 200-205.
 - [52] Soenen S.J., Parak W.J., Rejman J., Manshian B., *(Intra)Cellular Stability of Inorganic Nanoparticles: Effects on Cytotoxicity, Particle Functionality, and Biomedical Applications*, Chem. Rev.,115 (2015) 2109–2135.
 - [53] Gupta A.K, Gupta M., *Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications*, Biomaterials, 26 (2005) 3995–4021.
 - [54] Radomski A., Jurasz P., Alonso-Escolano D., Drews M., Morandi M., Malinski T., *Nanoparticle-induced platelet aggregation and vascular thrombosis*, Br J Pharmacol. 146 (2005) 82–93.
 - [55] Lin W., Huang Y.W., Zhou X.D., Ma Y., *In vitro toxicity of silica nanoparticles in human lung cancer cells*, Toxicol. Appl Pharmacol., 217 (2006) 252–259.
 - [56] Dua J.S., Rana A.C., Bhandari A.C., *Liposome: methods of preparation and applications*. International Journal of Pharmaceutical Studies and Research, 3 (2012) 14-20.
 - [57] Kumar K.P.S., Bhowmik D., Deb L., *Recent trends in liposomes used as novel drug delivery system*, The Pharma Innovation, 3 (2012) 29-38.
 - [58] Anwekar H., Patel S., Singhai A.K., *Liposome – as drug carries*. Int. J. of Pharm.and Life Scienc., 2 (2011) 945-951.
 - [59] Noble G.T, Stefanick J.F, Ashley J.D, Kiziltepe T, Bilgicer B. *Ligand-targeted Liposome Design: Challenges and Fundamental Considerations*, Trends in Biotechnology 32 (2014) 32-45.
 - [60] Akbarzadeh A., Rezaei-Sadabady R., Davaran S., Woo Joo S., Zarghami N., Hanifehpour Y., *Liposome: classification, preparation, and applications*, Nanoscale Res. Lett., 8 (2013) 1-9.
 - [61] Basu S.C., Basu M., *Methods in molecular biology: Liposome methods and protocols*, New Jersey, Humana Press, 2002.

-
- [62] Stebelska K., Wyrozumska P., Gubernator J., Sikorski A.F. *Highly fusogenic cationic liposomes transiently permeabilize the plasma membrane of HeLa cells*, Cell. Mol. Biol. Lett., 12 (2007) 39–50.
 - [63] Shashi K., Satinder K., Bharat P., *A complete review on: liposomes*, Inter. Res. J of Pharm., 3 (2012) 10-16.
 - [64] Torchilin V.P., *Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers*, Nature Reviews Drug Discovery, 4 (2005) 145-160.
 - [65] Benson H.A.E. *Transdermal drug delivery: penetration enhancement techniques*, Curr. Drug Deliv., 2 (2005) 23–33.
 - [66] Ulrich A.S., *Biophysical aspects of using liposomes as delivery vehicles*. Bioscience Reports, 22 (2002) 129-150.
 - [67] Liechty W.B., Kryscio D.R., Slaughter B.V., Peppas N.A., *Polymers for Drug Delivery Systems*. Annu. Rev Chem. Biomol., 15 (2010) 149–173.
 - [68] Lehr C.M., Bouwstra J.A., Schacht E.H., Junginger H.E., *In vitro evaluation of mucoadhesive properties of chitosan and some other natural polymers*, Int. J Pharm., 78 (1992) 43–48.
 - [69] Balaure P.C., Grumezescu A.M., *Smart synthetic polymer nanocarriers for controlled and site-specific drug delivery*, Curr Top Med Chem., 15 (2015) 1424-1490.
 - [70] Quintanar-Guerrero D., Allemann E., Fessi H., Doelker E., *Preparation techniques and mechanism of formation of biodegradable nanoparticles from preformed polymers*, Drug Dev Ind. Pharm., 24 (1998) 113–128.
 - [71] Suffredini G., East J.E., Levy L.M., *New Applications of Nanotechnology for Neuroimaging*, Am J Neuroradiol., 35 (2014) 1246-1253.
 - [72] Sinha V.R., Trehan A., *Biodegradable microspheres for protein delivery*, J. Controlled Release, 90 (2003) 261–280.
 - [73] Parveen S., Misra R., Sahoo S. K., *Nanoparticles: a boon to drug delivery, therapeutics, diagnostics and imaging*, Nanomedicine, 8 (2012) 147–166.
 - [74] Adams M.L., Lavasanifar A., Kwon G.S., *Amphiphilic block copolymers for drug delivery*, J Pharm Sci., 92 (2003) 1343-1355.
 - [75] Kataoka K., Harada A., Nagasaki Y., *Block copolymer micelles for drug delivery: Design, characterization and biological significance*, Adv. Drug Deliv. Rev 47 (2001) 113-131.
 - [76] Cabral H., Kataoka K., *Progress of drug-loaded polymeric micelles into clinical studies*. J. Controlled Release, 190 (2014) 465–476.
 - [77] Liu Y.L., Lin G.C., Wu C.S., *Preparation of polysulfone-poly(N isopropylacrylamide) graft copolymers through atom transfer radical polymerization and formation of temperature responsive nanoparticles*. J. Polym. Sci., 46 (2008) 4756-4765.
 - [78] Gaucher G., Dufresne M.H., Sant P.V., Kang N., *Block copolymer micelles: preparation, characterization and application in drug delivery*, J. Controlled. Release, 109 (2005) 169-188.
 - [79] Li J., He Z., Yu S., Li S., Ma Q., Yu Y., et al. *Micelles based on methoxy poly(ethylene glycol)-cholesterol conjugate for controlled and targeted drug delivery of a poorly water soluble drug*, J Biomed Nanotechnol., 8 (2012) 809–17.
 - [80] Hami Z., Amini M., Ghazi-Khansari M., Rezayat S.M., Gilani K., *Doxorubicin-conjugated PLA-PEG-Folate based polymeric micelle for tumor-targeted delivery: synthesis and in vitro evaluation*. Daru J Pharm Sci., 22 (2014) 22-30.
 - [81] Batrakova E.V., Dorodnych T.Y., Klinskii E.Y., Kliushnenkova E.N., Shemchukova O.B., Goncharova O.N., *Anthracycline antibiotics non-covalently incorporated into the block copolymer micelles: in vivo evaluation of anti-cancer activity*, Br J Cancer., 74 (1996) 1545–1552.

-
- [82] Wang T., Petrenko V.A., Torchilin V.P., *Paclitaxel-loaded polymeric micelles modified with MCF-7 cell-specific phage protein: enhanced binding to target cancer cells and increased cytotoxicity*. Mol Pharm., 7 (2010) 1007–1014.
 - [83] Bala V., Rao S., Boyd B.J., Prestidge C.A., *Prodrug and nanomedicine approaches for the delivery of the camptothecin analogue SN38.*, J. Controlled Release, 28 (2013) 48–61.
 - [84] Liu B., Yang M., Li R., Ding Y., Qian X., Yu L., Jiang X., *The antitumor effect of novel docetaxel-loaded thermosensitive micelles*, Eur J Pharm Biopharm., 69 (2008) 527-534.
 - [85] Klaikherd A., Nagamani C., Thayumanavan S., *Multistimuli sensitive amphiphilic block copolymer assemblies*, J Am Chem. Soc., 131 (2009) 4830-4838.
 - [86] Zhang Y., Huang Y., Li S., *Polymeric micelles: nanocarriers for cancer-targeted drug delivery*, AAPS Pharm. Sci. Tech., 15 (2014) 862–871.
 - [87] Malik N., Evagorou E.G., Duncan R., *Dendrimer-platinate: a novel approach to cancer chemotherapy*. Anticancer Drugs, 10 (1999) 767–776.
 - [88] Frechet J.M.J., Tomalia D.A., *Dendrimers and other dendritic polymers*, John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, 2001.
 - [89] Singh U., M.M. Dar, A.A. Hashmi, *Dendrimers: Synthetic Strategies, Properties and Applications*, Orient. J. Chem., 30 (2014) 911- 922.
 - [90] Beezer A.E., King A.S., Martin I.K., Mitchel J.C., Twyman L.J., Wain C.F., *Dendrimer as potential drug carriers: encapsulation of acidic hydrophobes within water soluble PAMAM derivatives*, Tetrahedron., 59 (2003) 3873–3880.
 - [91] Khandare J., Calderón M., Dagia N.M., Haag R., *Multifunctional dendritic polymers in nanomedicine: opportunities and challenges*. Chem. Soc. Rev., 41 (2012) 2824-2848.
 - [92] Khatri S., Das N.G., Das S.K., *Effect of methotrexate conjugated PAMAM dendrimers on the viability of MES-SA uterine cancer cells*. J Pharm. Bioallied. Sci., 6 (2014) 297–302.
 - [93] Balogh L., Bielinska A., Eichman J.D., Valluzzi R., Lee I., Baker J.R., Lawrence T.E., Khan M.K., *Dendrimer nanocomposites in medicine*, Chimica Oggi/Chemistry Today, 20 (2002) 35–40.
 - [94] Lai P.S., Lou P.J., Peng C.L., Pai C.L., Yen W.N., Huang M.Y., Young T.H., Shieh M.J., *Doxorubicin delivery by polyamidoamine dendrimer conjugation and photochemical internalization for cancer therapy*, J. Controlled. Release, 112 (2007) 39–46.
 - [95] Kolhe P., Misra E., Kannan R.M., Kannan S., Lieh-Lai M., *Drug complexation in vitro release and cellular entry of dendrimers and hyperbranched polymers*, Int. J. Pharm., 259 (2003) 143–160.
 - [96] Rabek J.F., *Współczesna wiedza o polimerach*, PWN, Warszawa, 2008.
 - [97] Bungeberg de Jong H.G., *Colloid Science II*, Elsevier, Amsterdam, 1949.
 - [98] Peppas N.A., Merrill E.W., *Hydrogels as swollen elastic networks*, J. Appl. Sci., 21 (1977) 1763-1770.
 - [99] Ratner B.D., Hoffman A.S., *Synthetic hydrogels for biomedical applications*, American Chemical Society, Washington, 1976.
 - [100] Rosiak J.M., Janik I., Kadłubowski S., Kozicki M., Kujawa P., Stasica P., *Radiation Formation of Hydrogels for Biomedical Application in Radiation Synthesis and Modification of Polymers for Biomedical Applications*, IAEA, Vienna, 2002.
 - [101] Hoffman A.S., *Hydrogels for biomedical applications*, Advanced Drug Delivery Reviews, 43 (2002) 3-12.
 - [102] Ullah F., Othman M.B.H., Javed F., Ahmad Z., Akil H.M., *Classification, processing and application of hydrogels: A review*, Mater. Sci. Eng. C, 57 (2015) 414–433.

-
- [103] Graham N.B., McNeill M.E., *Hydrogels for controlled drug delivery*, Biomaterials 5 (1984) 27-36.
 - [104] Gupta P., Vermani K., Garg S., *Hydrogels: from controlled release to pH-responsive drug delivery*, DDT 10 (2002) 569-578.
 - [105] Lifshitz I.M., Grosberg A.Y., Khokhlov A.R., *Some problems of the statistical physics of polymer chains with volume interaction*, Reviews of Modern Physics 50 (1978) 683-713.
 - [106] Tanaka T., *Collapse of Gels and the Critical Endpoint*, Phys. Rev. Lett., 40 (1978,) 820-823.
 - [107] Otake K., Inomata H., Konno M., Saito S., *Volume-phase transition of N-isopropylacrylamide gels induced by hydrostatic pressure*, Journal of Chem. Phys. 91 (1989) 1345-1350.
 - [108] Inoue T., Chen G., Nakamae K., Hoffman A. S., *Temperature sensitivity of a hydrogel network containing different LCST oligomers grafted to the hydrogel backbone*, Polym. Gels Network 5 (1997) 561-575.
 - [109] Zuo Y., Jiao Z., Ma L., Song P., Wang R., Xiong Y., *Hydrogen bonding induced UCST phase transition of poly(ionic liquid)-based nanogels*, Polymer, 98 (2016) 287-293.
 - [110] Moelbert S., de Los Rios P., *Hydrophobic interaction model for upper and lower critical solution temperatures*. Macromol., 36 (2003) 5845–5853.
 - [111] Jeong B., Kim S. W., Bae Y.H., *Thermosensitive sol-gel reversible hydrogels*, Adv. Drug Deliv. Rev., 54 (2002) 37-51.
 - [112] Malcolm G.N., Rowlinson J.S., *Thermodynamic properties of aqueous solutions of polyethylene glycol, polypropylene glycol and dioxane*, Trans. Faraday Soc, 53 (1957) 921–931.
 - [113] Heskins M., Guillet J.E., *Solution properties of poly (N-isopropylacrylamide)*. J. Macromol. Sci. Part A, 2 (1968) 1441–1455.
 - [114] Aoki T., Kawashima M., Katono H., Sanui K., Ogata N., Okano T., Sakurai Y., *Temperature-responsive interpenetrating polymer networks constructed with poly(acrylic acid) and poly(N, N-dimethylacrylamide)*, Macromol., 27 (1994) 947–952.
 - [115] Schild H.G., *Poly (N-isopropylacrylamide): Experiment, theory and application*, Progr. Polym. Sci., 17 (1992) 163–249.
 - [116] Zhang X.Z., Zhuo R.X., Cui J.Z., Zhang J.T., *A novel thermo-responsive drug delivery system with positive controlled release*, Int. J. Pharm., 235 (2002) 43-50.
 - [117] Dagani R., *Intelligent gels*. Chem. Eng. News, 75 (1997) 26-36.
 - [118] Azzaroni O., Brown A.A., Huck W.T.S., *UCST wetting transitions of polyzwitterionic brushes driven by self-association*. Angew. Chem. 118 (2006) 1802–1806.
 - [119] Tanaka T., Sun S.T., Nishio I., Swislow G., Shah A., *Phase transitions in ionic gels*. Phys. Rev. Lett., 45 (1980) 1636–1639.
 - [120] Buenger D., Topuz F., Groll J., *Hydrogels in sensing applications*. Prog. Polym. Sci., 37 (2012) 1678–1719
 - [121] Negishi M., Hiroki A., Miyajima M., Yoshida M., Asano M., Katakai R., *In vitro release control of ketoprofen from pH-sensitive gels consisting of poly(acryloyl-L-prolinemethyl ester) and saturated fatty acid sodium salts*. Radiat. Phys. Chem., 55 (1999) 167-172.
 - [122] Qiu Y., Park K., *Environment-sensitive hydrogels for drug delivery*, Adv. Drug Deliv. Rev., 53 (2001) 321–339.
 - [123] . Schmaljohann D., *Thermo- and pH-responsive polymers in drug delivery*. Adv. Drug Deliv. Rev., 58 (2006) 1655–1670.
 - [124] Rizwan M., Yahya R., Hassan A. ,Yar M., Azzahari A.D., Selvanathan V., Sonsudin F., Abouloula C.F., *pH Sensitive Hydrogels in Drug Delivery: Brief History, Properties,*

-
- Swelling, and Release Mechanism, Material Selection and Applications*, Polymers 9 (2017) 137-225.
- [125] Brazel C.S., Peppas N.A., *Synthesis and characterization of thermo-andchemomechanically responsive poly(N-isopolyacryloamide-co-methacrylic acid) hydrogels*, Macromol. 28 (1995) 8016-8020
- [126] Cartier S., Horbett T.A., Ratner B.D, *Glucose-sensitive commembrane coated porous filters for control of hydraulic permeability and insulin delivery from a pressurized reservoir*, J. Membr. Sci. 106 (1995) 17–24.
- [127] Ishihara K., Matsui K., *Glucose-responsive insulin release from polymer capsule*, J. Polym. Sci. Polym. Lett. Ed., 24 (1986) 413–417.
- [128] Parker R.S., Doyle F.J., Peppas N.A., *A model-based algorithm for blood glucose control in type I diabetic patients*, IEEE Trans. Biomed. Eng., 46 (1999) 148–157.
- [129] Ishihara K., Kobayashi M., Ishimaru N., Shinohara I., *Glucose induced permeation control of insulin through a complex membrane consisting of immobilized glucose oxidase and a poly(amine)*, Polym. J. 16 (1984) 625–631.
- [130] Brownlee M., Cerami A., *A glucose-controlled insulin delivery system: semisynthetic insulin bound to lectin*, Science 206 (1979) 1190–1191.
- [131] Kim S.W., Pai C.M., Makino K., Seminoff L.A., Holmberg D.L., Gleeson J.M, Wilson D.E., Mack E.J., *Self-regulated glycosylated insulin delivery*, J. Controlled Release, 11 (1990) 193–201.
- [132] Kokufuta E., Zhang Y.Q., Tanaka T., *Saccharide-sensitive phase transition of a lectin-loaded gel*, Nature, 351 (1991) 302–304.
- [133] Miyata T., Jikihara A., Nakamae K., Hoffman A.S., *Preparation of poly(2-glucosyloxyethyl methacrylate)–concanavalin A complex hydrogel and its glucose-sensitivity*, Macromol. Chem. Phys., 197 (1996) 1135–1146.
- [134] Kikuchi A., Suzuki K., Okabayashi O., Hoshino H., Kataoka K., Sakurai Y., Okano T., *Glucose-sensing electrode coated with polymer complex gel containing phenylboronic acid*, Anal. Chem., 68 (1996) 823–828.
- [135] Kataoka K., Miyazaki H., Bunya M., Okano T., Sakurai Y., *Totally synthetic polymer gels responding to external glu-cose concentration: their preparation and application to on– off regulation of insulin release*, J. Am. Chem. Soc. 120m (1998) 12694–12695.
- [136] Aoki T., Nagao Y., Sanui K., Ogata N., Kikuchi A., Sakurai Y., Kataoka K., Okano K., *Glucose-sensitive lower critical solution temperature changes of copolymers composed of N-isopropylacrylamide and phenylboronic acid moieties*, Polym. J. 28 (1996) 371–374.
- [137] Hollinger J.O., *Biomedical Applications of Synthetic Biodegradable Polymers*, CRC Press, Boca Raton, FL, 1995.
- [138] Hovgaard L., Brøndsted H., *Dextran hydrogels for colon-specific drug delivery*, J. Controlled Release 36 (1995) 159–166.
- [139] Yamamoto N., Kurisawa M., Yui N., *Double-stimuli-responsive degradable hydrogels: interpenetrating polymer networks consisting of gelatin and dextran with different phase separation*, Macromol. Rapid Commun. 17 (1996) 313–318.
- [140] Kurisawa M., Terano M., Yui N., *Double-stimuli-responsive degradation of hydrogels consisting of oligopeptide-terminated poly(ethylene glycol) and dextran with an interpenetrating polymer network*, J. Biomater. Sci. Polym., 8 (1997) 691–708.
- [141] Yeh P.Y., Kopeckova P., Kopecek J., *Biodegradable and pH-sensitive hydrogels: synthesis by crosslinking of N, N dimethylacrylamide copolymer precursors*, J. Polym. Sci.Part A. Polym. Chem., 32 (1994) 1627–1637.
- [142] Yeh P.Y, Kopeckova P., Kopecek J., *Degradability of hydrogels containing azoaromatic crosslinks*, Macromol. Chem. Phys., 196 (1995) 2183–2202.

-
- [143] Circu L.M., Yee Aw. T., *Glutathione and apoptosis*, Free Radic. Res., 42 (2008) 689-706.
- [144] Schafer F.Q., Buettner G.R., *Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple*, Free Radic. Biol. Med., 30 (2001) 1191-1212.
- [145] Wu G., Fang Y.Z., Yang S., Lupton J.R., Turner N.D., *Glutathione metabolism and its implications for health*, J. Nutr., 134 (2004) 489-492.
- [146] Kakizawa Y., Harada A., Kataoka K., *Glutathione sensitive stabilization of block copolymer micelles composed of antisense DNA and thiolated poly(ethylene glycol)-blockpoly(L-lysine): A potential carrier for systemic delivery of antisense DNA*, Biomacromol.s, 2 (2001), 491-497.
- [147] Yap H.P., Johnston A.P.R., Such G.K., Yan Y., Caruso F., *Click-engineered, bioresponsive, drug-loaded PEG spheres*, Adv. Mater., 21 (2009) 4348-4352.
- [148] Groll J., Singh S., Albrecht K., Moeller M., *Biocompatible and degradable nanogels via oxidation reactions of synthetic thiomers in inverse miniemulsion*, J. Polym.Sci. Polym. Chem., 47 (2009) 5543-5549.
- [149] Curcio M., Gomez L.D., Cirillo G., Concheiro A., Iemma F, Lorenzo C.A., *pH/redox dual-sensitive dextran nanogels for enhanced intracellular drug delivery*, Eur J Pharm and Biopharm., 117 (2017) 324-332.
- [150] Shahbasi M.A, Bauleth-Ramos T., Santos H.A, DNA, *Hydrogel Assemblies: Bridging Synthesis Principles to Biomedical Applications*, Adv. Therap. 1(2018) 1800042.
- [151] Kahn J.S, Hu Y., Willner I. *Stimuli-Responsive DNA-Based Hydrogels: From Basic Principles to Applications*, Acc. Chem. Res. 50 (2017) 680-690.
- [152] Cheng E., Xing Y., Chen P., Yang Y., Sun Y., Zhou D., Xu L., Fan Q., Liu D., *A pH-triggered, fast-responding DNA hydrogel* Angew. Chem. Int. 48 (2009) 7660-7663.
- [153] Lee J.B., Peng S., Yang D., Roh Y.H., Funabashi H., Park N., E. Rice J E., Chen L., Long R., Wu M., Luo D., *A mechanical metamaterial made from a DNA hydrogel*, Nat. Nanotechnol. 7 (2012) 816-820.
- [154] Park N., Um S.H., Funabashi H, Xu J., Luo D., *A cell-free protein-producing gel*, Nat. Mater. 8(2009) 432-437.
- [155] Xing Y., Cheng E., Yang Y., Chen P., Zhang T., Sun Y., Yang Z., Liu D., *Self-assembled DNA hydrogels with designable thermal and enzymatic responsiveness.*, Adv. Mater. 23 (2011) 1117.
- [156] Jin J, Xing Y., Xi Y., Liu X., Zhou T., Ma X., Yang Z., Wang S., Liu D., *A triggered DNA hydrogel cover to envelop and release single cells*. Adv. Mater. 25 (2013) 471-4717.
- [157] Nöll T, Schönherr H, Wesner D, Schopferer M, Paululat T, Nöll G. *Construction of three-dimensional DNA hydrogels from linear building blocks*, Angew. Chem. 53 (2014) 8328-8332.
- [158] Xiong X., Wu C., Zhou C., Zhu G., Chen Z., Tan W., *Responsive DNA-based hydrogels and their applications*, Macromol. Rapid Commun. 34 (2013) 1271- 1283.
- [159] Guo W., Qi X.-J., Orbach R, Lu C.-H., Freage L., Mironi-Harpaz I, Seliktar D., Yang H.-H, Willner I., *Reversible Ag⁺-crosslinked DNA hydrogels* Chem.Comm., 50 (2014) 4065-4068.
- [160] Liedl T, Dietz H, Yurke B, Simmel F., *Controlled Trapping and Release of Quantum Dots in a DNA-Switchable Hydrogel*, Small, 3(2007):1688-1693.
- [161] He X.J., Weiz B., Mi Y.L., *Aptamer based reversible DNA induced hydrogel system for molecular recognition and separation*, Chem. Commun., 46 (2010) 6308-6310.

-
- [162] Murakami Y., Maeda M. *Hybrid hydrogels to which single-stranded (ss) DNA probe is incorporated can recognize specific ssDNA*, *Macromolecules* 38 (2005)1535-1537.
 - [163] Murakami Y., Maeda M., *DNA-responsive hydrogels that can shrink or swell*, 6 (2005) 2927-2929.
 - [164] Whitesides G.M., *Nanoscience, nanotechnology, and chemistry*, *Small*, 1 (2005) 172-179.
 - [165] Saunders B.R., Vincent B., *Microgel particles as model colloids: theory, properties and applications*, *Advances in Colloid and Interface Science*, 80 (1999) 1-25.
 - [166] Ulanski P., Rosiak J.M., *Polymeric Nano/Microgels*, *Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology* 8 (2004) 845–871
 - [167] Murray M.J., Snowden M.J., *The preparation, characterisation and applications of colloidal microgels*, *Advances in Colloid and Interface Science*, 54 (1995) 73-91,
 - [168] Bencherif S.A., Siegwart D.J., Srinivasan A., Horkay F., Hollinger J., *Nanostructured hybrid hydrogels prepared by a combination of atom transfer radical polymerization and free radical polymerization*, *Biomaterials*, 30 (2009) 5270–5278.
 - [169] Lowe J.S., Chowdhry B.Z., Parsonage J.R., Snowden M.J., *The preparation and physico-chemical properties of poly(N-ethylacrylamide) microgels*, *Polymer*, 39 (1998) 1207-1212.
 - [170] Pelton R., *Temperature-sensitive aqueous microgels*, *Advances in Colloid and Interface Science*, 85 (2000) 1–33.
 - [171] Yu S., Hu J., Pan X., Yao P., Jiang M., *Stable and pH-sensitive nanogels prepared by self-assembly of chitosan and ovalbumin*, *Langmuir*, 22 (2006) 2754-2759.
 - [172] Burmistrova A., Klitzing R., *Control of number density and swelling/shrinking behavior of P(NIPAM-AAc) particles at solid surfaces*, *J. Mater. Chem.*, 20 (2010) 3502-3507.
 - [173] Ge J., Neofytou e., Cahill T.J., Beygui R.E., Zare R.N., *Drug release from electric field responsive nanoparticles*, *ACS Nano*, 6 (2012) 227–233.
 - [174] Maya S., Sarmiento B., Nair A., Rejinold N.S., Nair S.V., Jayakumar R., *Smart stimuli sensitive nanogels in cancer drug delivery and imaging: a review*, *Curr Pharm Des.*, 41 (2013) 7203-7218.
 - [175] Dorwal D., *Nanogels as novel and versatile pharmaceuticals*, *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 4 (2012) 67-74.
 - [176] Rigogliuso S., Sabatinob M.A., Adamoa G., Grimaldib N., Dispenzab C., *Nanogels: Nanocarriers for drug delivery application*, *Chemical Engineering Transactions*, 27 (2012) 247-252.
 - [177] Zarekar N.S., Lingayat V.J., Pande V.V., *Nanogel as a Novel Platform for Smart Drug Delivery System*, *Nanoscience and Nanotechnology Research*, 4 (2017) 25-31.
 - [178] Simoes S., Moreira J.N., Fonseca C., Pedroso de Lima M.C., *On the formulation of pH-sensitive liposomes with long circulation Times*, *Adv Drug Deliv Rev.* (2004) 947–965.
 - [179] Voets I.K., Keizer A.D., Stuart M.A.C., *Core and corona structure of mixed polymeric micelles*, *Macromolecules* 39 (2006) 5952–5955.
 - [180] Katz E., Willner I., *Integrated nanoparticle-biomolecule hybrid systems: Synthesis, properties, and applications*, *Angew. Chem.*, 43 (2004) 6042–6108.
 - [181] Labhasetwar V., Leslie-Pelecky D.L., *Biomedical applications of nanotechnology*, John Wiley & Sons, Hoboken, NJ, USA, 2007
 - [182] Aliyer H.A., Hamilton P.D., Remsen E.E., Ravi N., *Synthesis of polyacrylamide nanogels by intramolecular disulfide cross-linking*, *J Bioact. Compat. Polym.*, 22 (2005) 169–181.
 - [183] Haback M., *Temperature-sensitive gels: From tissue engineering to drug delivery*. *Drug Discov Today*, 6 (2001) 553–554.

-
- [184] Gupta A.K., Madan S., Majumdar D., K, Maitra A., *Ketorolac entrapped in polymeric micelles: Preparation, characterization and ocular anti-inflammatory studies*. Int J Pharm., 209 (2000) 1–14.
 - [185] Sahoo S.K., De T.K., Ghosh P.K., Maitra A., *pH- and thermo-sensitive hydrogel nanoparticles*. J Colloid Polym Sci., 206 (1998) 361–368.
 - [186] Kara S., Pekcan O., *Lattice heterogeneities at various crosslinker contents—a gel swelling study*, Polymer, 41 (2000) 8735– 8739.
 - [187] Peng S., Wu C., *Surfactant Effect on pH and Temperature Sensitivities of Poly(N-vinylcaprolactam-co-sodium acrylate) Microgels*, Macromolecules, 34 (2001) 568–571.
 - [188] Lyon L.A., Debord J.D., Debord S.B., Jones C.D., McGrath J.G., Serpe M.J. *Microgel colloidal crystals*, J. of Physic. Chem. B, 108 (2004) 19099–19108.
 - [189] Eichenbaum G.M., Kise P.F. , Dobrynin A.V., Simon S.A., Needham D., *Investigation of the swelling response and loading of ionic microgels with drugs and proteins: The dependence on cross-link density*, Macromol., 32 (1999) 4867–4878.
 - [190] Gilbert R.G., *Emulsion Polymerization: a mechanistic approach*, Academic Press, London, 1995
 - [191] Antonietti M., Basten R., Lohmann S., *Polymerization in microemulsions - a new approach to ultrafine, highly functionalized polymer dispersions*, Macromol. Chem. Phys., 196 (1995).441–466.
 - [192] Funke W., Okay O., Joos-Muller B., *Microgels - intramolecularly crosslinked macromolecules with a globular structure*, Adv. Polym Sci., 136 (1998)139–234.
 - [193] Chen L.W., Yang B.Z., Wu M.L., *Synthesis and kinetics of microgel in inverse emulsion polymerization of acrylamid*, Progr. Org. Coatings 31 (1997)1313–1322.
 - [194] Antonietti M., Landfester K., *Polyreactions in miniemulsions*, Prog. Polym. Sci. 27 (2002) 689–757.
 - [195] Pelton R., *Temperature-sensitive aqueous microgels*, Adv. in Colloid and Interf. Sci. 85 (2000) 1–33.
 - [196] Shimizu H., Wada R., Okabe M., *Preparation and Characterization of Micrometer-Sized Poly (N-isopropylacrylamide) Hydrogel Particles*, Polymer Journal 41 (2009) 771–777.
 - [197] Saunders B.R., Crowther H.M., Vincent B., *Poly(methyl methacrylate)-co-(methacrylic acid) microgel particles: swelling control using pH, cononsolvency and osmotic deswelling*.Macromolecules, 30 (1997) 482 - 487.
 - [198] Saunders B.R., Vincent B., *Osmotic de-swelling of polystyrene microgel polystyrene microgel particles*, In. Colloid Polymer Sci., 275 (1997) 9–17.
 - [199] Liu T., Liuu H., Wu Z., Chen T., Zhou L., Liang Y., Ke B., Huang H., Jiang Z., Xie M., Wu T., *The use of poly(methacrylic acid) nanogel to control the release of amoxycillin with lower cytotoxicity*, Materials Sci. and Eng. C, 43 (2014) 622–629.
 - [200] Saunders B.R., *On the structure of poly (N-isopropylacrylamide) microgel particles*. Langmuir, 20 (2004) 3925 –3932.
 - [201] Kratz K., Hellweg T., Eimer W., *Influence of charge density on the swelling of colloidal poly(N-isopropylacrylamide-co-acrylic acid) microgels*, Colloid Surface A, 170 (2000) 137–149.
 - [202] Snowden M.J., Chowdhry, B.Z. Vincent B., Morris G. E, *Colloidal copolymer microgels of N-isopropylacrylamide and acrylic acid: pH, ionic strength and temperature effects*, J. Chem. Soc., 92(1996) 5013–5016.
 - [203] Eckmann D.M., Composto R.J., Tsourkas A., Muzykantov V.R., *Nanogel carrier design for targeted drug delivery*, J Mater. Chem. B, 2 (2014) 8085–8097.

-
- [204] Khmelnitsky Y.L., Neverova I.N., Gedrovich A.V., *Catalysis by alpha-chymotrypsin entrapped into surface-modified polymeric nanogranules in organic solvent*. Eur. J Biochem. 210 (1992) 751–757
 - [205] Kang H., Trondoli A.C., Zhu G., Chen Y., Chang Y.J., Liu H., Huang Y.F, Zhang X., Tan W., *Near-Infrared Light-Responsive Core–Shell Nanogels for Targeted Drug Delivery*, ACS Nano, 5 (2011) 5094–5099.
 - [206] Oberoi H.S., Nukolova N.V., Laquer F.C., *Cisplatin-loaded core cross-linked micelles: comparative pharmacokinetics, antitumor activity, and toxicity in mice*, Int. J. Nanomedicine 7 (2012) 2557–2571.
 - [207] Matsumoto N.M., Gonzalez-Toro D.C., Chacko R.T., *Synthesis of nanogel-protein conjugates*, Polym. Chem., 4 (2013) 2464–2469.
 - [208] Akiyoshi K, Kobayashi S, Shichibe S., *Self-assembled hydrogel nanoparticle of cholesterol-bearing pullulan as a carrier of protein drugs: complexation and stabilization of insulin*, J Controlled Release 54 (1998) 313–320.
 - [209] Lee H, Mok H, Lee S., *Target-specific intracellular delivery of siRNA using degradable hyaluronic acid nanogels*, J Controlled Release 119 (2007) 245–252.
 - [210] Li R, Wu W, Song H., *Well-defined reducible cationic nanogels based on functionalized low-molecular-weight PGMA for effective pDNA and siRNA delivery*, Acta Biomater., 41 (2016) 282–292.
 - [211] Zhang S., *Emerging biological materials through molecular selfassembly*, Biotechnol Adv 20 (2002) 321–339.
 - [212] Bronich T.K., Vinogradov S.V., Kabanov A.V., *Interaction of nanosized copolymer networks with oppositely charged amphiphilic molecules*, Nano Lett., 1 (2001) 535–540.
 - [213] Choi K.Y., Lee S., Park K., Kim K., Park J.H., Kwon I.C., Jeong S.Y., *Preparation and characterization of hyaluronic acid-based hydrogel nanoparticles*. J. Phys. Chem. Solids, 69 (2008) 1591–1595.
 - [214] Demidov V.V., M.D. Frank-Kamenetskii, *Two sides of the coin: Affinity and specificity of nucleic acid interactions*, Trends Biochem. Sci., 29 (2004) 62–71.
 - [215] Asami Y., Yoshioka K., Nishina K., Nagata T., Yokota T., *Drug delivery system of therapeutic oligonucleotides*, Drug Disc.& Therap.10 (2016) 256-262.
 - [216] Seeman N.C., *An overview of structural DNA nanotechnology*, J. Mol. Biotechnol., 37 (2007) 246–257.
 - [217] Watson J., Crick F., *A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid*, Nature, 171 (1953) 737-738.
 - [218] Sinden R.R, *DNA Structure and Function*, Academic Press, 1994.
 - [219] Watson J.D., Baker T.A., Bell S.P., Gann A., Levine M., Losick, R.M., *Molecular biology of the gene*, Pearson Int. Edit., London 2006.
 - [220] Crick F., *Central dogma of molecular biology*, Nature, 227 (1970) 561–563.
 - [221] Wilkins M.H.F., Stokes A.R, Wilson H.R., *Molecular Structure of Deoxypentose Nucleic Acids*, Nature, 171 (1953) 738-740.
 - [222] Nakamoto K., Tsuboi M., Strahan G.D, *Drug-DNA Interactions. Structures and Spectra*, John Wiley & Sons Inc., New Jersey, 2008.
 - [223] Minamoto T., Mai M. Ronai Z., *Environmental factors as regulators and effectors of multistep carcinogenesis*, Carcinogenesis, (1999) 519–527.
 - [224] Leadon S.A., *Repair of DNA Damage Produced by Ionizing Radiation: A Minireview*, Semin Radiat Oncol., 6 (1996) 295-305.
 - [225] Hildebrandt B., Wust P., Ahlers O., *The cellular and molecular basis of hyperthermia*, Critical Reviews in Oncology/Hematology 43 (2002) 33–56.

-
- [226] Lodish H., Berk A., Zipursky S.L., *Molecular Cell Biology*, W.H. Freeman; New York, 2000.
 - [227] Rollins R.A., Haghighi F., Edwards J.R., Das R., Zhang M.Q., Ju J., Bestor T.H. *Large-scale structure of genomic methylation patterns*, *Genome Res.*, 16 (2007) 157–163.
 - [228] Shimoi K., Okitsu A., Green M.H.L., Lowe J.E., Ohta T., Kaji K., Terato H., Ide H., Kinae N., *Oxidative DNA damage induced by high glucose and its suppression in human umbilical vein endothelial cells*, *Mutation Research*, 480 (2001) 371-378.
 - [229] Khodosevich K., Lebedev Y., Sverdlov E., *Endogenous retroviruses and human evolution*, *Comp. and Funct. Gen.* 3 (2002) 494-498.
 - [230] Lerman, L.S., *Structural considerations in the interactions of DNA and acridines*, *J. Mol. Biol.*, 3 (1961) 18-30.
 - [231] Waring, M.J., *Variation of the supercoils in closed circular DNA by binding of antibiotics and drugs: Evidence for molecular models involving intercalation*, *J. Mol. Biol.* 54 (1970) 247-279.
 - [232] Berman; H. M., Young, P. R. *The interaction of intercalating drugs with nucleic acids*. *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* 10 (1981) 87-114.
 - [233] Grochow L., Ames M.A., *clinician's guide to chemotherapy – Pharmacokinetics and pharmacodynamics*, Williams and Wilkins, Baltimore, 1998.
 - [234] Chaires J.B., Herrera J.E., Waring M.J.: *Preferential binding of daunomycin to 5'ATCG and 5'ATGC sequences revealed by footprinting titration experiments*, *Biochemistry*, 29 (1990) 6145–6153
 - [235] Wallace K.B., *Doxorubicin-induced cardiac mitochondriopathy*, *Pharmacology & Toxicology*, 93(2003) 105-115.
 - [236] Pommier Y., Leo E., Zhang H., Marchand C., *DNA topoisomerases and their poisoning by anticancer and antibacterial drugs*, *Chem. Biol.*, 17 (2010) 421-433.
 - [237] Jones R.L., Swanton C., Ewer M.S., *Anthracycline cardiotoxicity*. *Expert Opin. Drug. Saf.* 5 (2006) 791-809.
 - [238] Wiess Raymond B., *The anthracyclines: will we ever find a better doxorubicin?* *Seminars in Oncology* 19 (1992) 670-686.
 - [239] Paleček E., *Oscillographic Polarography of Highly Polymerized Deoxyribonucleic Acid*, *Nature*, 188 (1960) 656–657.
 - [240] Paleček E., *From polarography of DNA to microanalysis with nucleic acid-modified electrodes*, *Electroanal.*, 8 (1996) 7-14.
 - [241] Genereux, J. C.; Barton, J. K., *Mechanisms for DNA Charge Transport*, *Chem. Rev.*, 110 (2010) 1642-1662.
 - [242] Paleček E., Fojta M., *Detecting DNA hybridization and damage*, *Anal Chem.*, 73(2001) 74A-83A.
 - [243] Paleček E., Bartosik M., *Electrochemistry of Nucleic Acid*, *Chemical Reviews*, 112 (2012) 3427-3481.
 - [244] Cygański A., *Metody spektroskopowe w chemii analitycznej*, Wydawnictwa Naukowo –Techniczne, Warszawa, 2002.
 - [245] Lu G. W , Gao P. *Emulsions and Microemulsions for Topical and Transdermal Drug Delivery*, *Handbook of Non-Invasive Drug Delivery Systems*, Elsevier ,Oxford,2010, 59-94.
 - [246] Lovrić M., *Electroanalytical Methods*, Springer-Verlag, Berlin, 2002
 - [247] Osteryoung J., O'Dea J., *Square-wave voltammetry*, *Electroanalytical Chemistry*, 14, Marcel Dekker, New York, 1986.

-
- [248] Paleček E., Scheller.F., Wang J., *Electrochemistry of nucleic acids and proteins – towards electrochemical sensors for genomics and proteomics*, Amsterdam, Elsevier, 2005
- [249] Lee J.B., Peng S., Yang D., Roh Y.H, Funabashi H., Park N., et al, *A mechanical metamaterial made from a DNA hydrogel*, Nature Nanotech. 7 (2012) 816-820.
- [250] Lee J.B., Peng S., Yang D., Roh Y.H., Funabashi H., Park N. et al, *A mechanical metamaterial made from a DNA hydrogel*, Nature Nanotech. 7 (2012) 816-820.
- [251] Kremer M., Pothmann E., Bassle T.R. , Baker J., Yee A., Blanch H., Prausnitz J.M., *Pore-Size distributions of cationic polyacrylamide hydrogels varying in initial monomer concentration and cross-linker/monomer ratio*, Macromolecules 27 (1994) 2965-2970.
- [252] Nowicka A.M, Zabost E., Gilant E., Stojek Z., *Influence of percentage of guanine molecules, OH radicals, UV irradiation and temperature on electrooxidation of short synthetic oligonucleotides*, Phys. Chem. Chem. Phys. 13 (2011) 7500–7507.
- [253] Zabost E., Nowicka A.M., Donten M.,Stojek Z., *Substantial difference between temperature dependencies of dsDNA predenaturation process obtained by voltammetry and spectroscopy*, Phys. Chem. Chem. Phys. 11 (2009) 8933–8938.
- [254] McGhee J.D.,von Hippel P.H, *Theoretical aspects of DNA-protein interactions: co-operative and non-co-operative binding of large ligands to a one-dimensional homogeneous lattice*, J. Mol. Biol., 86 (1974) 469–489.
- [255] Ritger P., Peppas N., *A simple equation for description of solute release. I. Fickian and non-Fickian release from non-swellable devices in the form of slabs, spheres, cylinders or discs*, J. Controlled. Release, 5 (1987) 23–36.
- [256] Kremer M., Pothmann E., Bassler T.R., Baker J, Yee A, Blanch H., Prausnitz J.M, *Pore-Size distributions of cationic polyacrylamide hydrogels varying in initial monomer concentration and cross-linker/monomer ratio*, Macromolecules 27 (1994) 2965-2970.
- [257] Sanson C., Schatz C., Le Meins J.F., Soum A., Thevenot J., Garanger E., et al, *A simple method to achieve high doxorubicin loading in biodegradable polymersome*, J. Contr. Release 147 (2010) 428-435.
- [258] Galaev I., Mattiasson B., *Smart Polymers, Applications in Biotechnology and Biomedicine*, CRC Press, New York, 2008.
- [259] Sultana F., Manirujjaman M., Imran-Ul-Haque, Arafat M., Sharmin S., *An Overview of Nanogel Drug Delivery*, System. J. Appl.Pharm. Sci. 3 (2013) 95-105.
- [260] Vinogradov S.V., *Nanogels in the race for drug delivery*, Nanomedicine 5 (2010) 165–168.
- [261] Soheyla H., Foruhe Z., *Effect of Zeta Potential on the Properties of Nano-Drug Delivery Systems - A Review (Part 2)* Trop. J Pharm. Res.,12 (2013) 265-273.
- [262] Holowka E.P., Bhatia S.K., *Drug Delivery: Materials Design and Clinical Perspective*, Springer Science & Busines, New York, 2014.
- [263] D'Abramo M., Castellazzi C.L., Orozco M., Amadei A., *On the nature of DNA hyperchromic effect*. J. Phys. Chem. B 117 (2013) 8697–8704.
- [264] Dolinnaya N.; Metelev V., Oretskaya T. Tabatadze D.; Shabarova Z., *Hairpinshaped DNA duplexes with disulfide bonds in sugar-phosphate backbone as potential DNA reagents for crosslinking with proteins*. FEBS Letters, 444 (1999) 285-290.
- [265] Takada T.; Barton, J.K. *DNA Charge transport leading to disulfide bond formation*, JACS 127 (2005) 12204–12205.